



HAL
open science

La Drosophile comme modèle pour l'étude de la maladie d'Alzheimer : rôle de la protéine précurseur Amyloïde dans la mémoire olfactive

Isabelle Bourdet

► To cite this version:

Isabelle Bourdet. La Drosophile comme modèle pour l'étude de la maladie d'Alzheimer : rôle de la protéine précurseur Amyloïde dans la mémoire olfactive. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2014. Français. NNT : 2014PA066256 . tel-01374732

HAL Id: tel-01374732

<https://theses.hal.science/tel-01374732>

Submitted on 1 Oct 2016

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

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



Université Pierre et Marie Curie

Ecole doctorale Cerveau-Cognition-Comportement

*Laboratoire Gènes et Dynamique des Systèmes de Mémoire,
CNRS UMR 8249 - ESPCI, 10 rue Vauquelin, 75005 PARIS*

Thèse de doctorat

Spécialité Neurosciences

La Drosophile comme modèle pour l'étude de la Maladie d'Alzheimer :

Rôle de la Protéine Précurseur Amyloïde dans la mémoire olfactive.

présentée par

Isabelle Bourdet

pour obtenir le grade de docteur de l'Université Paris VI

Soutenue publiquement le 26 septembre 2014, devant un jury composé de :

Pr Charles Duyckaerts	Représentant de Paris VI
Dr Magalie Lecourtois	Rapporteuse
Dr Hervé Tricoire	Rapporteur
Dr Nicolas Sergeant	Examineur
Dr Valérie Goguel	Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier les rapporteurs Dr Magalie Lecourtois et Dr Hervé Tricoire pour leurs commentaires sur ce manuscrit de thèse, ainsi que les membres du jury Pr Charles Duyckaerts et Dr Nicolas Sergeant d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

Je remercie également Thomas Prémat pour m'avoir offert l'opportunité de réaliser une thèse dans son équipe et pour son enthousiasme scientifique. Je voudrais exprimer ma gratitude à Valérie Goguel, ma directrice de thèse, qui par son soutien indéfectible m'a permis d'aller au bout de ces trois années.

Je remercie surtout tous ceux que j'ai eu l'occasion de croiser, ou parfois de mieux connaître, au cours de ces trois ans au sein du laboratoire, et qui par leur écoute et leurs conseils, m'ont permis de mener à bien cette expérience. Les anciens membres du *jdb* : Séverine, Quentin, Guillaume, Julien, Abdoul, Alex, Anne-Lise, Marlène, Clémence ; les actuels (pour certains tout juste ou bientôt partis !) : Delphine, Leiore, Lisa, Marie, Gaëtan, Raouf, Alexandra, Ana, Sophie, Mathieu... Cette thèse n'aurait pas eu le même sens sans cette unité que vous représentez et faites perdurer. Merci également aux membres de l'équipe sans qui le projet ne serait ce qu'il est : Aurélie, Paul, Oriane, Bénédicte, Gunnar, Thomas, Danae, Honorine, Alex, Daniela, Liliane, Annie... Merci aussi à tous les membres du laboratoire : Karim, Marcel, Hélène, Thierry, Armelle, Damien, Anne, Sophie, Marie, Lucie, Céline, Elodie, Serge, André, Baya, Mathilde, Sylvie, Sopharith, Léna, Malika, les stagiaires au court passage et tous ceux que j'oublie en écrivant ces lignes pour l'atmosphère qui règne dans l'unité. Quelques mentions spéciales : à Eric bien sûr, pour ta façon particulière de faire sonner 18h et le rendez-vous laitier du jeudi ; à Ghislain, pour les nombreuses initiations, les tours à deux ou quatre roues, pour Bébinou, je te souhaite le meilleur pour cette ultime année ; Pym, tu as été une infinie pilule de rire, merci pour ces deux folles années ; et enfin, Emna, merci pour tes leçons toutes en finesse, c'est inestimable d'avoir partagé ces derniers mois avec toi, merci pour toutes tes attentions et le petit monde volant, et... vivement la suite !

J'aimerais aussi saluer les copains, les amis et les amours qui sont tous, par leur ivresse de vie, ce que je chéris le plus mais qui n'aurait pas lieu d'être dévoiler ici (pardon aux déçus, i.e. bouya). Je tiens juste à exprimer toute mon affection à mon oncle Gérard. Je te souhaite que l'espace qui se réduit ouvre des horizons inconnus. Et enfin, merci à Arnaud et Zsolt pour m'avoir orienter vers cette thèse.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif qui se manifeste, entre autres, par une détérioration progressive de la mémoire. Le peptide amyloïde ($A\beta$), composant principal des plaques séniles retrouvées dans le cerveau des patients, a longtemps été considéré comme le principal responsable de ce dysfonctionnement mnésique. Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine du déclin de la mémoire restent à ce jour inconnus. Le peptide $A\beta$ est produit par la protéolyse d'une protéine transmembranaire appelée Protéine Précurseur Amyloïde (APP). APP subit deux voies de maturation exclusives. La voie non-amyloïdogénique, majoritaire, est initiée par l' α -sécrétase, et produit notamment une forme sécrétée neuroprotective, sAPP α . La voie amyloïdogénique, après clivages successifs par les β - et γ -sécrétases, aboutit à la sécrétion du peptide $A\beta$. Dans des conditions pathologiques, la voie amyloïdogénique serait favorisée, éventuellement au détriment de la voie non-amyloïdogénique. Il a été proposé qu'en plus de l'effet néfaste de l'accumulation d' $A\beta$, une perte de fonction d'APP puisse jouer un rôle dans le dysfonctionnement cognitif associé à la MA, en particulier au début de la maladie.

La drosophile possède un orthologue d'APP, APP-like (APPL), soumis à deux voies de maturation similaires à celles d'APP. La drosophile est capable de former différents types de mémoire dont les caractéristiques moléculaires principales sont partagées avec les organismes supérieurs. Le laboratoire a mis en évidence l'implication d'APPL chez la mouche adulte dans la mémoire olfactive associative (Goguel et al., 2011). Au cours de ma thèse, nous avons poursuivi deux objectifs : 1) identifier le ou les métabolites d'APPL impliqués dans la mise en place de la mémoire, et 2) analyser l'incidence de la surexpression de la voie amyloïdogénique chez le jeune adulte. Nous avons pour cela développé un modèle permettant à la fois de diminuer le niveau d'APPL endogène, et d'exprimer sous contrôle d'un pilote d'expression inductible un transgène d'intérêt spécifiquement dans les Corps Pédonculés, le centre de l'apprentissage et de la mémoire olfactive chez l'adulte. Nous avons démontré grâce à ce modèle que les formes sécrétée et non-protéolysée d'APPL sont chacune suffisante pour compenser le déficit de mémoire à court-terme lié à la perte partielle d'APPL. Nous avons aussi montré que favoriser la production de formes sécrétées au détriment des formes non protéolysées, en surexprimant l' α -sécrétase, exacerbe ce déficit mnésique, suggérant que ces deux formes d'APPL sont requises conjointement pour la mise en place de la mémoire. D'autre part, nous avons montré que la surexpression de la β -sécrétase ou celle du peptide $A\beta$ (d $A\beta$) de drosophile, n'est délétère pour la mémoire que lorsqu'elle est associée à une inhibition d'APPL. Nous avons ainsi mis à jour deux types d'interaction fonctionnelle entre APPL et ses métabolites : une interaction positive entre les formes sécrétées et membranaires, qui pourrait sous-tendre la mise en place de la mémoire dans des conditions physiologiques, et une interaction négative entre APPL et d $A\beta$, qui pourrait au contraire participer à l'aggravation des déficits mnésiques observés au cours de l'évolution de la MA.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disorder characterized by a progressive deterioration of memory. The amyloid peptide ($A\beta$), the principal component of senile plaques found in patients' brains, has been considered as the main cause of memory dysfunction. However, the exact molecular mechanisms that underlie memory decline remain unknown. $A\beta$ is produced by the proteolysis of a transmembrane protein named Amyloid Precursor Protein (APP). APP undergoes two exclusive processing pathways : the non-amyloidogenic pathway initiated by the α -secretase generates a secreted APP form (sAPP α), that has been shown to be neuroprotective, while the amyloidogenic pathway leads to the production of $A\beta$ via sequential cleavages by the β - and γ -secretases. Under pathological conditions, processing via the amyloidogenic pathway would be increased, possibly at the expense of the other pathway. It has been suggested that in addition to the accumulation of $A\beta$, APP loss of function may play a crucial role in the cognitive dysfunction associated with AD, especially at the onset of the disease.

Drosophila contains a single APP ortholog APP-like (APPL), that undergoes processing pathways similar to that of APP. *Drosophila* has a highly structured brain and is capable of producing a large number of sophisticated behaviors. *Drosophila* memories share the main molecular characteristics with those of higher organisms. In the laboratory, we aim to analyse APPL physiological role in memory processes. We have previously highlighted in young flies the involvement of APPL in associative olfactory memory (Goguel et al., 2011). During my thesis, we sought firstly to identify which form of APPL, among its numerous metabolites, is critical for memory, and secondly, to analyze the effect of promoting the amyloidogenic pathway in the young adult brain. For this purpose, we developed a model that allows both to reduce the level of endogenous APPL, and to express transgenes of interest under the control of an inducible driver in the adult center of olfactory memory, the Mushroom Bodies. We have demonstrated that the secreted form of APPL and also the non-proteolysed APPL are each sufficient to compensate for the memory deficit associated with APPL partial loss of function. We further showed that favoring the production of sAPPL at the expense of the full-length form, by overexpressing the α -secretase, is detrimental, suggesting that they are both required for memory. We next showed that overexpression of either the *Drosophila* β -secretase or *Drosophila* $A\beta$ peptides exacerbate the memory deficit caused by APPL partial loss of function. Our results suggest several types of functional interactions between APPL and its metabolites: a positive interaction between the full length membrane and the secreted form - which would underlie implementation of memory under physiological conditions - and a negative interaction between APPL and d $A\beta$ - which would rather participate to the progression of the memory decline observed during AD.

TABLE DES MATIERES

Résumé	5
Abstract	7
Table des Figures	13
Liste des abréviations	15
INTRODUCTION	17
Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer.....	17
Le premier cas clinique	17
La MA est une démence : définition, incidence et diagnostic	18
Facteurs de risque.....	19
Les facteurs de risque génétiques liés aux formes sporadiques.....	19
Les facteurs liés à l'environnement.....	20
Les mutations liées aux formes héréditaires.....	20
Aspects neuropathologiques de la MA	21
Les dégénérescences neurofibrillaires	21
Les plaques amyloïdes	22
La Protéine Précurseur Amyloïde (APP).....	23
Expression du gène APP.....	24
Structure d'APP	24
Localisation et trafic subcellulaires d'APP.....	25
Traitement protéolytique d'APP.....	26
Fonction d'APP et de ses métabolites	31
Homologues d'APP	33
Modèles animaux.....	34
Modèles murins transgéniques amyloïdogéniques	35
Les modèles en « perte de fonction » d'APP	37
Déficits cognitifs des modèles transgéniques murins de la MA.....	37
Apports et limites des modèles murins.....	38
L'hypothèse amyloïde et sa remise en cause	40
Les données en faveur de l'hypothèse amyloïde	41
La remise en cause de l'hypothèse amyloïde.....	42
Les hypothèses alternatives.....	43
Chapitre 2. Le modèle drosophile.....	47
Un modèle pour l'étude de maladies humaines	47
Des outils génétiques	49
Les transposons	49

Le système UAS/GAL4.....	49
Le système inductible GeneSwitch.....	50
Le système inductible thermosensible TARGET.....	50
Un modèle pour l'étude de la mémoire.....	50
Anatomie du système nerveux central.....	52
Le traitement de l'information olfactive.....	53
Les Corps Pédonculés, centre de la mémoire olfactive.....	55
Le conditionnement olfactif aversif et le test de mémoire.....	55
Différents protocoles induisent différents types de mémoire.....	57
Dynamique des mémoires aversives et mécanismes moléculaires sous-jacents.....	57
La Protéine Précurseur Amyloïde- <i>like</i> , l'orthologue d'APP.....	61
Conservation fonctionnelle entre APP et APPL.....	61
APPL est impliquée dans le développement du système nerveux et la mémoire olfactive.....	62
APPL subit une protéolyse similaire à celle d'APP.....	63
Modéliser la MA chez la drosophile.....	64
Les modèles drosophile amyloïdogéniques.....	65
La recherche d'interactions génétiques.....	66
Le test de composés chimiques.....	66
Des peptides A β endogènes ?.....	66
La surexpression d'APPL induit certains des phénotypes de la MA.....	67
Projet de thèse.....	69
APPL est requis chez l'adulte pour la mémoire.....	69
Objectif 1 : Identifier les espèces APPL impliquées dans la mémoire.....	69
Objectif 2 : Etudier la voie amyloïdogénique chez le jeune adulte.....	69
MATERIELS ET METHODES.....	73
Elevage et maintenance des drosophiles.....	73
Expression de transgènes d'intérêts.....	73
Comportement.....	74
Conditionnement aversif olfactif.....	74
Test de mémoire.....	76
Calcul de l'indice de performance.....	76
Test de l'olfaction.....	77
Test d'évitement aux chocs électriques.....	77
Biologie moléculaire.....	78
Extraction d'ARN, dégradation de l'ADN génomique et synthèse d'ADNc.....	78
« Polymerase Chain Reaction » quantitative (qPCR).....	78
Extraction de protéines totale ou fractionnée.....	79
Western blot.....	80
Analyses statistiques.....	80

RESULTATS.....	83
Partie 1. Identification des espèces APPL impliquées dans la mémoire olfactive chez la drosophile	83
« La forme membranaire non-protéolysée de l'orthologue d'APP chez la drosophile est impliquée dans la formation de la mémoire »	83
Introduction	83
Résultats principaux	84
Article 1	86
Résultats additionnels	118
Résultats complémentaires : tous les mutants APPL non-protéolysables sauve le déficit de STM induit par la perte partielle d'APPL.....	120
Partie 2. Rôle de la voie amyloïdogénique dans la mémoire olfactive chez la drosophile adulte.....	125
« Le peptide amyloïde exacerbe le déficit de mémoire causé par l'inhibition d'APPL chez la drosophile adulte »	125
Introduction	125
Résultats principaux	126
Article 2.....	126
Résultats additionnels	152
DISCUSSION	155
APPL est impliquée dans la mémoire	155
En plus d'un défaut de LTM, une forte inhibition d'APPL induit un défaut de STM	156
Les formes sécrétée et non-protéolysée d'APPL sont requises conjointement pour la mémoire à court-terme	159
APPL ^S compense la perte partielle d'APPL pour l'établissement de la STM.....	159
Dans quelle structure neuronale APPL ^S agit-elle ?.....	160
Favoriser la formation d'APPL sécrétée endogène révèle que la forme membranaire est aussi requise pour la STM.....	160
Interaction fonctionnelle entre sAPPL et APPL.....	162
Pourquoi un rôle de la forme membranaire d'APP dans la mémoire n'a jamais été rapporté dans les études mammifères ?	163
Tous les mutants APPL ^{sd} non-protéolysables sauvent la mémoire.....	164
Chez le jeune adulte, l'expression de dA β exacerbe le déficit de mémoire causé par une perte de fonction partielle d'APPL.....	165
Une surproduction de dA β limitée et transitoire n'affecte pas la mémoire	165
Nature de l'interaction fonctionnelle dA β /APPL	167
Conclusion générale.....	169
 ANNEXE : Analyse de la voie Wnt-PCP dans la mémoire olfactive chez la drosophile adulte.....	 171
BIBLIOGRAPHIE	176

Table des Figures

Figure 1. Lésions neuropathologiques caractéristiques de la Maladie d'Alzheimer.....	22
Figure 2. Localisation et structure du gène APP.....	24
Figure 3. Représentation de la structure tridimensionnelle d'APP.....	25
Figure 4. Les deux voies de protéolyse d'APP.....	27
Figure 5. Transport et localisation des étapes de maturation d'APP dans un neurone.....	27
Figure 6. Sites de clivage des sécrétases et mutations du gène APP associées.....	30
Figure 7. Exemples des fonctions cellulaires auxquelles participent les métabolites d'APP.....	33
Figure 8. Comparaison des séquences protéiques des homologues de la famille APP.....	34
Figure 9. La cascade amyloïde.....	41
Figure 10. Le système inductible GeneSwitch.....	51
Figure 11. Représentation schématique du cerveau de la drosophile.....	54
Figure 12. Représentation schématique du système olfactif de la drosophile.....	54
Figure 13. Principe du conditionnement olfactif aversif et du test de mémoire.....	56
Figure 14. Les deux voies parallèles de formation des mémoires aversives.....	58
Figure 15. Stratégie employée pour la construction de la lignée déficiente <i>Appl^d</i>	61
Figure 16. Homologies de séquence entre APP et APPL.....	62
Figure 17. Les deux stratégies dominantes pour générer des modèles Drosophile de la MA.....	65
Figure 18. Comparaison des séquences des peptides amyloïdes humains, souris et drosophile.....	67
Figure 19. Matériel de conditionnement et de test.....	77
Figure 21. L'expression de l'ARNi- <i>Appl</i> 108321 sous contrôle du promoteur inductible <i>tubGAL80^{ts}</i> ; <i>238Y</i> affecte la STM.....	118
Figure 22. L'inhibition de <i>kuzbanian</i> dans les CPs adultes n'affecte pas la STM.....	119
Figure 23. Les différents mutants APPL ^{sd}	121
Figure 24. L'expression de tous les mutants APPL ^{sd} permet de compenser le déficit de STM lié à la perte partielle d'APPL.....	123
Figure 25. La surexpression de BACE1 dans les CPs adultes affecte la STM lorsqu'elle est associée à une perte de fonction APPL partielle.....	152
Figure 26. Modèle d'interaction entre APPL et la voie Wnt-PCP pour le développement axonal chez la drosophile.....	172
Figure 27. Moduler l'activité de Abelson dans les CPs adultes de mouches sauvages n'affecte pas la STM.....	173
Figure 28. Inhiber l'expression de Abelson dans les CPs adultes d'hétérozygotes <i>Appl^d</i> affecte la STM.....	174
Figure 29. Moduler l'activité de Dishevelled dans les CPs adultes n'affecte pas la STM.....	175

Liste des abréviations

ADAM : <i>a disintegrin and metalloprotease</i> , α -sécrétase	elav : <i>embryonic lethal abnormal visual</i> , pilote d'expression panneuronal
AICD : domaine intracellulaire d'APP	GPCR : récepteur couplé aux protéines G
AMPC : AMP cyclique	KPI : <i>Kunitz-type serine protease inhibitor</i>
APH-1 : <i>anterior pharynx-defective 1</i>	KUZ : <i>kuzbanian</i> , homologue de l' α -sécrétase
APLP1, APLP2 : <i>APP-like protein 1</i> et 2	LTM : mémoire à long-terme
ApoE : apolipoprotéine E	LTP : potentialisation à long terme
APP : Protéine Précurseur Amyloïde	MA : maladie d'Alzheimer
APPL : <i>APP-like</i> , homologue d'APP	MBSw : <i>Mushroom Bodies Gal4-Sw</i> , pilote d'expression inductible spécifique des CPs
Appl ^d : <i>Appl deficient</i> , allèle nul APPL	PACAP : <i>pituitary adenylyl-cyclase</i> <i>activating peptide</i>
APPL ^s : <i>APPL secreted</i>	PCP : <i>planar cell polarity</i>
APPL ^{sd} : <i>APPL secretion defective</i>	PEN-2 : <i>presenilin enhancer 2</i>
APP _{swe} : mutation suédoise d'APP	PKA : protéine kinase A
ARM : mémoire résistante à l'anesthésie	PSN, PS1, PS2 : présénilines 1 et 2
ARNi : ARN interférent	RU : RU486, ligand de Gal4-Sw
A β : peptide amyloïde	Rut : adénylate cyclase Rutabaga
BACE1 : <i>beta-site APP cleaving enzyme 1</i> , β -sécrétase	sAPP α : fragment sécrété d'APP issu de la coupure α
CPs : corps pédonculés	STM : mémoire à court terme
CREB : <i>cAMP-response element binding</i>	TGN : réseau trans-golgien
CTF : fragment C-terminal	UAS : <i>upstream activating sequence</i>
dBACE : <i>Drosophila BACE</i> , homologue de la β -sécrétase	
DNF : dégénérescence neurofibrillaire	
dPSN : <i>Drosophila PSN</i>	

INTRODUCTION

Chapitre 1 : La maladie d'Alzheimer

La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif dont la première manifestation clinique est la perte des souvenirs récents. La prévalence de la MA étant plus forte chez les personnes âgées, les premières amnésies sont souvent confondues avec le déclin cognitif lié au vieillissement normal. En effet, l'âge est le premier facteur de risque de la maladie. Avec l'allongement de l'espérance de vie, le nombre de malades est amené à augmenter de façon exponentielle ces prochaines décennies, et la recherche de traitements contre la MA apparaît comme un enjeu de société majeur. Il existe des formes sporadiques et des formes héréditaires de la maladie. Ces dernières apparaissent précocement (avant 60 ans) et se caractérisent par un déclin mnésique plus rapide. Elles ont été associées à des mutations sur les gènes codant la protéine précurseur amyloïde (APP) et les présénilines (PSN). Sur le plan histologique, la MA se distingue par la présence de lésions cérébrales particulières : les plaques amyloïdes et les dégénérescences neurofibrillaires. Malgré la caractérisation de ces lésions, l'identification de facteurs de risque génétiques, et le développement de nombreux modèles animaux, les mécanismes pathologiques responsables du déclin cognitif restent largement incompris. L'objectif de ma thèse a été d'apporter des données sur la fonction d'APP dans la mémoire. Nous avons pour cela étudié, chez la drosophile, le rôle de l'orthologue drosophile APP-like (APPL) dans la mémoire olfactive associative.

Le premier cas clinique

Le 4 novembre 1906, le psychiatre et neuropathologiste Aloïs Alzheimer présente devant une assemblée de confrères réunie à Tübingen, un cas de démence atypique. L'âge de la patiente – 51 ans lorsqu'elle est prise en charge – déteint avec le profil clinique d'une démence sénile. Dans l'article « *Une maladie grave et caractéristique du cortex cérébral* » qu'il publie un an plus tard (Alzheimer, 1907; traduction anglaise, Stelzmann et al., 1995), Alzheimer décrit la condition d'Auguste Deter. Elle présentait « *parmi les premiers symptômes de sa maladie, un fort sentiment de jalousie envers son mari. Elle montra très vite des signes de dégradation importante de la mémoire ; elle était désorientée, elle déplaçait les objets n'importe où dans son appartement et les cachait. Parfois elle avait l'impression que quelqu'un cherchait à la tuer, ce qui la faisait hurler. Elle mourut après quatre ans et demi de*

maladie. » Ces quelques lignes résument à elles-seules l'altération précoce des capacités mnésiques et la détérioration progressive de la condition cognitive qui mène ultimement au décès du patient. Alzheimer adjoint à cette description clinique les observations qu'il tire de l'analyse *post-mortem* des tissus cérébraux de la patiente. Utilisant une méthode de coloration à l'argent, il observe, en plus de lésions d'athérosclérose, deux types de lésions particulières : des neurofibrilles « *au centre d'une cellule apparemment normale se dressent une ou plusieurs fibrilles caractérisées par leur épaisseur et leur imprégnabilité particulière* » et des plaques « *de nombreux et petits foyers miliaires se trouvent dans les couches supérieures. Ils sont caractérisés par l'accumulation d'une substance particulière dans le cortex* ».

La présence de ces lésions neuropathologiques particulières, associée au jeune âge de la patiente, font l'originalité du cas présenté par Alzheimer (Castellani et al., 2010). Dans la huitième édition du *Handbook of Psychiatry*, son collègue Emil Kraepelin introduit l'appellation *maladie d'Alzheimer* (Kraepelin, 1910). L'expression sera par la suite employée plus largement, à tort, pour toutes sortes de démences séniles et préséniles.

La MA est une démence : définition, incidence et diagnostic

La démence est définie par l'organisation mondiale de la santé (OMS) comme « un syndrome, chronique ou évolutif, dans lequel on observe une altération de la fonction cognitive (capacité à effectuer des opérations de pensée), plus importante que celle que l'on pourrait attendre du vieillissement normal. Elle affecte la mémoire, le raisonnement, l'orientation, la compréhension, le calcul, la capacité d'apprentissage, le langage et le jugement. La conscience n'est pas touchée. Une détérioration du contrôle émotionnel, du comportement social ou de la motivation accompagne, ou précède, les troubles de la fonction cognitive. »

La démence est aujourd'hui considérée comme la principale cause de handicap et de dépendance parmi les personnes âgées dans le monde, elle a des conséquences économiques importantes. L'OMS indique que la démence touche dans le monde 35,6 millions de personnes et que ce nombre devrait doubler tous les 20 ans. En 2010, le coût sociétal total de la démence était estimé à 1 % du produit intérieur brut mondial. À l'heure actuelle, il n'existe pas de traitement qui permette de guérir de la démence ou d'en modifier l'évolution. L'on estime à 70 % la proportion des cas de démence imputables à la MA.

Le diagnostic clinique de la MA n'est pas un diagnostic d'exclusion car la présence des lésions cérébrales initialement décrites par Alzheimer est requise pour poser le diagnostic définitif. Jusqu'au développement récent de techniques d'imagerie cérébrale, celui-ci ne pouvait donc être posé qu'après l'examen anatomo-pathologique des tissus cérébraux des patients, c'est pourquoi les données épidémiologiques actuelles ne distinguent pas formellement la MA des autres démences séniles.

La MA est une démence qui affecte en particulier la mémoire. Le diagnostic clinique est généralement établi sur la base du MMSE (Mini Mental State Examination, Folstein et al., 1975) et permet de définir le stade d'avancement de la pathologie. De façon simple, l'on distingue trois stades d'évolution de la MA : (i) la *phase préclinique*, durant laquelle seule la mémoire épisodique est altérée ; (ii) la *phase clinique précoce*, au cours de laquelle la mémoire épisodique se détériore, et les capacités verbales, attentionnelles et visuo-spatiales sont atteintes. Les fonctions exécutives peuvent être aussi diminuées. (iii) La *phase clinique avancée* est déclarée lorsque le dysfonctionnement mnésique est généralisé et sévère. Lorsque les capacités sensori-motrices restent intactes, il semble que la mémoire procédurale soit préservée (Buckner, 2004). L'espérance de vie moyenne varie de 2 à 8 ans selon l'âge du patient au moment du diagnostic (Brookmeyer et al., 2002).

Facteurs de risque

On estime que la MA affecte 0,5 % de la population de moins de 65 ans, et que cette proportion double par tranche d'âge de 5 ans jusqu'à atteindre 15 % chez les plus de 85 ans. L'âge constitue donc le premier facteur de risque de développer la MA. La très grande majorité des cas de MA est de type sporadique, c'est-à-dire qu'elle ne présente pas de transmission mendélienne classique ; une minorité des cas (estimée à moins de 5 %) est héréditaire (Campion et al., 1999; Mayeux and Stern, 2012).

Les facteurs de risque génétiques liés aux formes sporadiques

Il existe une composante génétique pour les formes sporadiques de la maladie illustrée par le fait que le risque de déclarer la MA est multiplié par trois si un apparenté au premier degré est touché, par sept si deux ou plus le sont. De plus, les femmes sont de 1,5 à 2 fois plus touchées que les hommes. Les études d'associations génétiques ont permis d'identifier plusieurs allèles de susceptibilité à la MA. Parmi eux, l'allèle de l'apolipoprotéine E 4 (ApoE4), présent chez 10 à 20 % de la population, multiplie par deux le risque de développer la

pathologie (Strittmatter et al., 1993). A ce jour, plus de 1300 études portant sur plus de 660 gènes ont été rapportées. Afin de référencer, améliorer la visibilité de ces études, et rendre possible des méta-analyses, une base de données publique a été créée : AlzGene (www.alzforum.org ; Bertram et al., 2007).

Les facteurs liés à l'environnement

Plusieurs facteurs de risque liés à l'environnement et à la qualité de vie ont été associés à la MA. Parmi eux, l'on peut citer les maladies cardiovasculaires, le tabagisme et le diabète de type II, ainsi que le faible niveau de revenus et d'instruction, l'exposition à l'aluminium et aux solvants organiques, et les microtraumatismes crâniens répétés. D'autres facteurs environnementaux apparaissent, eux, protecteurs : l'activité physique et l'interaction sociale jusqu'à un âge avancé, la consommation régulière de vin rouge en petites quantités, ainsi que les traitements anti-inflammatoires à base de substances non stéroïdiennes, le traitement hormonal de substitution ou la consommation régulière d'anti-oxydants. Toutes les études menées jusqu'à présent n'établissent que des liens de corrélation et l'impact de ces facteurs reste largement débattu (Mayeux and Stern, 2012).

Les mutations liées aux formes héréditaires

La petite proportion des cas héréditaires de la MA est liée à la transmission de mutations autosomiques dominantes (Campion et al., 1999). Hormis leur apparition plus précoce et leur symptomatologie plus agressive, ces formes familiales semblent en tous points similaires aux cas sporadiques. Leur étude sert donc de base pour la compréhension des mécanismes moléculaires et des dysfonctionnements neuronaux responsables de la MA. Trois gènes ont été incriminés : le gène APP et les gènes codant les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2) (Chartier-Harlin et al., 1991; Goate et al., 1991; Murrell et al., 1991; Levy-Lahad et al., 1995; Rogaev et al., 1995; Sherrington et al., 1995; et pour revue, St George-Hyslop and Petit, 2005). Il subsiste aujourd'hui 10 % des formes familiales de la MA répertoriées en France dont la mutation n'a pas été identifiée (Raux et al., 2005).

Les mutations du gène APP sont impliquées dans 15 à 20 % des cas héréditaires de la MA. Une trentaine de mutations ponctuelles sont aujourd'hui répertoriées ; toutes nommées selon l'origine géographique des familles chez qui elles ont été trouvées. Seules deux d'entre elles, identifiées plus récemment, sont des mutations récessives (Tomiya et al., 2008; Di Fede et al., 2009). La duplication du gène APP, présent sur le chromosome 21, conduit systématiquement au développement de la MA, associée à une angiopathie amyloïde

cérébrale (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Les personnes souffrant du syndrome de Down (trisomie 21) développent précocement une démence de type MA. Très récemment, la première mutation protectrice contre la MA a été identifiée, elle affecte aussi la séquence APP (Jonsson et al., 2012), ce qui démontre le rôle central de cette protéine dans la pathologie. Les mutations affectant les gènes des PSN sont encore plus nombreuses. A l'heure actuelle sont décrites 182 mutations pour le gène PS1, et 14 pour PS2 (Lambert and Amouyel, 2007). Les PSN sont des enzymes impliquées dans la protéolyse de la protéine APP.

Aspects neuropathologiques de la MA

Sur le plan histologique, la MA se caractérise par une atrophie cérébrale symétrique, un élargissement des sillons cérébraux et une dilatation des ventricules latéraux contenant le liquide céphalorachidien (Dickerson and Sperling, 2009) (Figure 1A). La réduction du volume cérébral est due à une perte neuronale et synaptique massive dans la région de l'hippocampe, des lobes temporaux et des cortex primaires moteurs, sensoriels et visuels (Cash et al., 2013). Au niveau microscopique, la MA se distingue par la présence conjointe des deux types de lésions initialement décrites par Alzheimer : les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires et les plaques amyloïdes extracellulaires (Figure 1B-E). La répartition de ces lésions correspond aux zones où l'on observe de la perte neuronale, ce qui suggère un lien causal entre elles et la neurodégénérescence (Masliah et al., 1990; Urbanc et al., 2002).

Les dégénérescences neurofibrillaires

Les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) sont des inclusions filamenteuses présentes dans le cytoplasme de neurones en dégénérescence (Figure 1B,C,E). Elles sont constituées de paires de filaments appariés en hélice formées par la protéine tau sous sa forme hyperphosphorylée (Crowther, 1991).

La protéine tau, de la famille des MAP (Microtubule-Associated Proteins) est principalement exprimée par les neurones et participe au maintien dynamique du cytosquelette, tout particulièrement dans la zone distale des axones. Tau participe à la polymérisation de la tubuline en microtubules et les stabilise en formant des liaisons avec l'actine (Fulga et al., 2007). L'isoforme de tau la plus longue possède 79 résidus sérine et thréonine, dont 20 à 30 sont phosphorylés dans des conditions non pathologiques. L'hyperphosphorylation de tau au niveau des résidus centraux favorise son agrégation et

diminue son affinité pour les microtubules ce qui entraîne leur dépolymérisation (Wegmann et al., 2010). Les causes de l'hyperphosphorylation de tau ne sont pas connues.

L'observation des DNF a permis de distinguer six stades d'évolution de la MA corrélés à la gravité de l'atteinte cognitive (Braak and Braak, 1991). En dehors de la MA, d'autres maladies neurologiques sont imputables à des dysfonctionnements de la protéine tau ; elles sont qualifiées de tauopathies.

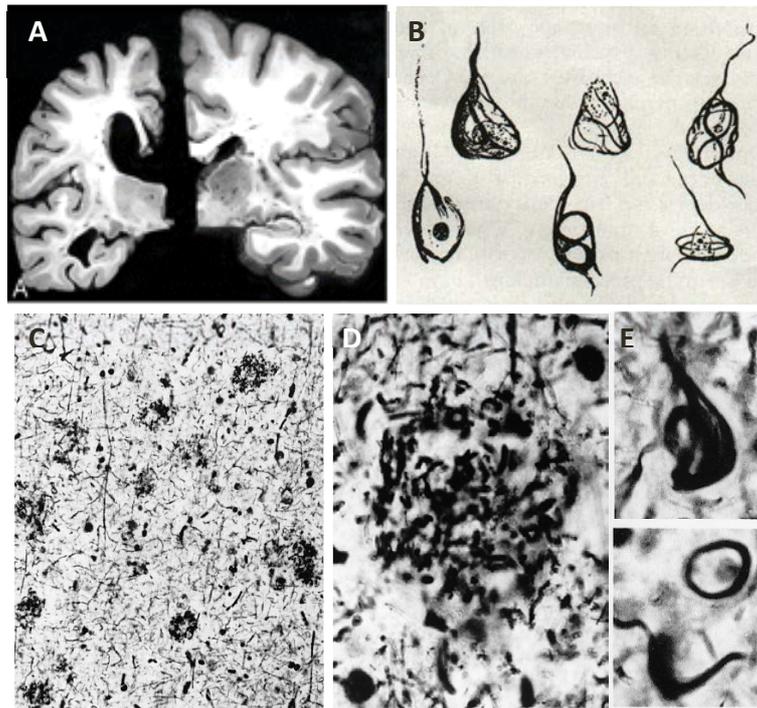


Figure 1. Lésions neuropathologiques caractéristiques de la Maladie d'Alzheimer.

A. Atrophie cérébrale. Gauche, sujet MA ; droite, sujet sain. **B.** Dessins de neurofibrilles (A. Alzheimer). **C.** Coupe histologique du cortex cérébral d'A. Deter (coloration Bielschowsky, x20). **D.** Plaque Amyloïde (x63) **E.** Neurofibrilles (x63) (Graeber et al., 1998).

Les plaques amyloïdes

Les plaques amyloïdes, appelées aussi plaques séniles, sont des dépôts extracellulaires hétérogènes de 10 à 160 μm de long (Figure 1C,D) constitués principalement d'un petit peptide de 4 kDa, le peptide amyloïde ($A\beta$). Le terme amyloïde, introduit en 1854 par Rudolph Virchow, signifie « qui présente une coloration positive à l'iode » (Sipe and Cohen, 2000). La structure et la composition des plaques amyloïdes ont été révélées grâce à plusieurs autres colorants, parmi lesquels le rouge Congo et la thioflavine S sont les plus couramment utilisés. Le peptide $A\beta$ s'agrège sous forme de fibrilles en feuillets bêta plissés insolubles, et résistants à la protéolyse. Une trentaine de composés peut être présente dans les plaques,

parmi lesquels l'ApoE, les héparanes sulfates, les protéoglycanes, et d'autres facteurs témoignant d'une réaction inflammatoire environnante (Sipe and Cohen, 2000).

L'on distingue deux types de plaques séniles : les plaques denses et les plaques diffuses. Leur ultrastructure révélée en microscopie électronique est différente. Les plaques denses comportent un noyau central en forme d'étoile dont les branches s'étendent vers la périphérie où elles contactent des processus astrocytaires, microgliaux ou neuronaux en dégénérescence, également appelés neurites dystrophiques. Ces neurites dystrophiques contiennent des DNF, de nombreuses mitochondries et des corps denses d'origine mitochondriale et/ou lysosomale (Kidd, 1964; Itagaki et al., 1989). Les plaques diffuses présentent un centre clair, non immunoréactif aux anticorps A β et ne sont pas ou très peu associées à des processus dystrophiques (Joachim et al., 1989). Les plaques denses sont présentes en abondance dans le cerveau de patients atteints de la MA tandis que les plaques diffuses peuvent être retrouvées dans le cerveau de personnes âgées au déclin cognitif normal (Joachim et al., 1989).

Ainsi, considérées séparément, les DNF et les plaques amyloïdes ne sont pas spécifiques de la MA. C'est leur présence conjointe et leur répartition topographique dans le cerveau qui permet d'établir le diagnostic définitif de la maladie (Mott and Hulette, 2005). Actuellement, se développent des techniques de marquage des plaques séniles qui permettraient de poser le diagnostic de la MA avant le décès du patient. Ces techniques associent la tomographie par émission de positons (TEP) et le marqueur PiB (composé B de Pittsburg) à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) (Cohen and Klunk, 2014).

La Protéine Précurseur Amyloïde (APP)

Le peptide A β est produit au cours de la protéolyse d'APP, une protéine transmembranaire de type I (Haass et al., 1992; Shoji et al., 1992). Le fait qu'A β soit le composant principal des plaques séniles a concentré l'effort de recherche sur sa toxicité et son mode de production. En revanche, le rôle physiologique de son précurseur reste globalement incompris alors même que le gène APP a été cloné il y a plus de 25 ans (Goldgaber et al., 1987; Tanzi et al., 1987). Deux obstacles majeurs entravent l'étude de la fonction d'APP : 1) la protéine subit plusieurs voies de maturation complexes au cours desquelles sont produits de nombreux métabolites qui exercent des fonctions très distinctes, et 2) APP appartient à une famille protéique conservée au cours de l'évolution, si bien que les animaux modèles mammifères possèdent plusieurs homologues exprimant de la redondance fonctionnelle et limitent ainsi les études en perte de fonction.

Expression du gène APP

Le gène APP est situé dans la région distale 21q 21.3 du chromosome 21 (Goldgaber et al., 1987). Plusieurs isoformes sont générées par épissage alternatif. Parmi les isoformes de la protéine APP actuellement décrites, trois sont majoritaires : APP₆₉₅, APP₇₅₁ et APP₇₇₀, nommées selon le nombre d'acides aminés qu'elles contiennent (Figure 2). APP₆₉₅ est présente exclusivement dans les neurones, APP₇₅₁ et APP₇₇₀ dans les cellules gliales, le système immunitaire et la plupart des tissus périphériques (Kawarabayashi et al., 1991). Bien que le gène APP soit exprimé de façon ubiquitaire, la forme neuronale APP₆₉₅ est majoritaire et particulièrement exprimée au cours du développement.

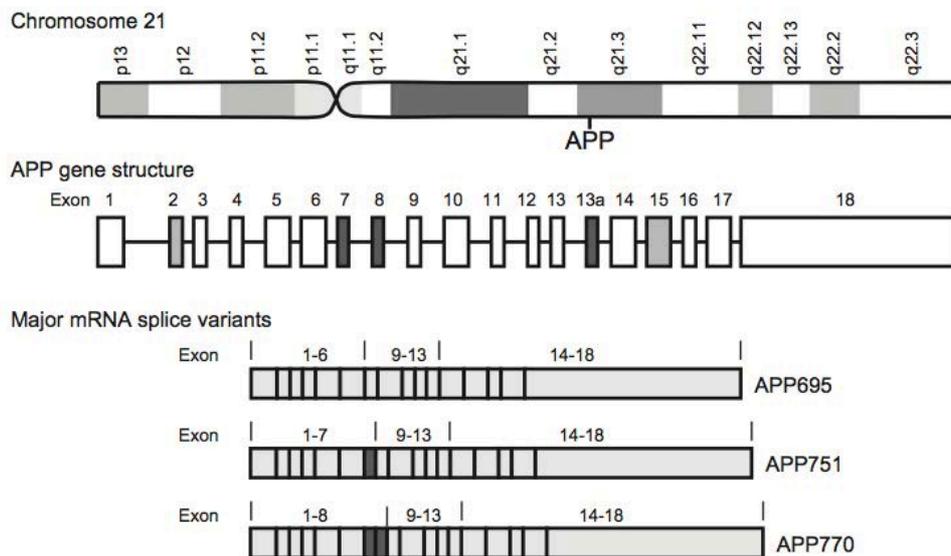


Figure 2. Localisation et structure du gène APP.

Le gène APP est situé sur la région 21q 21.3 du chromosome 21, il est composé de 18 exons. L'épissage alternatif des exons 7, 8 et 13a (gris foncé) produit les trois isoformes majoritaires du gène APP. (Dawkins and Small, 2014)

Structure d'APP

APP est une protéine transmembranaire de type I. Toutes les isoformes d'APP sont composées d'un grand domaine extracellulaire, un domaine transmembranaire et un court domaine cytoplasmique, une structure typique de récepteur membranaire (Kang et al., 1987). La partie extracellulaire contient deux larges domaines E1 et E2. Le domaine E1 est constitué d'un domaine de liaison à l'héparine et un domaine de liaison aux ions métalliques Cu²⁺ et Zn²⁺. APP₇₅₁ et APP₇₇₀ possèdent un domaine KPI (Kunitz-type serine protease inhibitor) dans la partie extracellulaire qui est absent de la forme neuronale APP₆₉₅ (Kitaguchi et al.,

1988). La partie intracellulaire contient un site de liaison aux protéines G(o) et une séquence d'internalisation (motif YENTPY) à l'extrémité C-terminale. Le domaine protéique correspondant au peptide A β est situé du côté N-terminal du domaine transmembranaire, à la surface cellulaire, une partie de ce domaine étant incorporé dans la membrane (Figure 3).

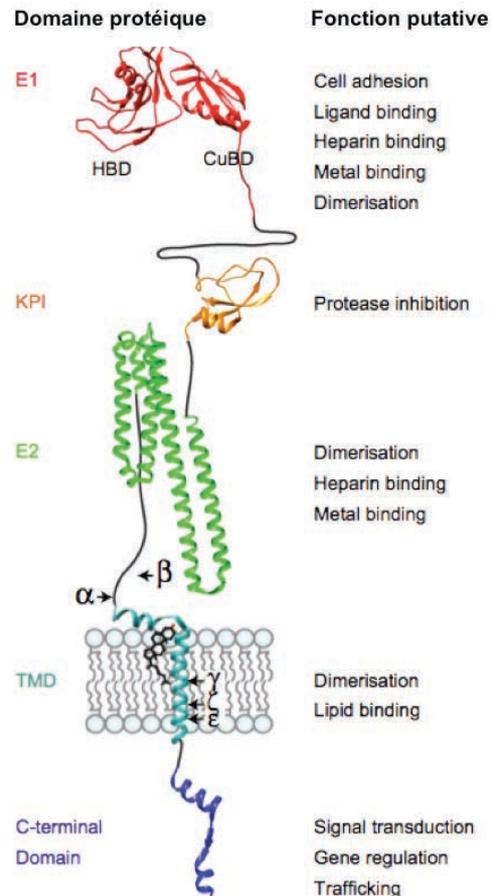


Figure 3. Représentation de la structure tridimensionnelle d'APP.

APP possède plusieurs domaines protéiques conservés chez ses homologues dont les fonctions avérées ou putatives sont indiquées. HBD (heparin binding domain), CuBD (Cu²⁺ Binding Domain), KPI (Kunitz-type serine Protease Inhibitor), TMD (transmembrane domain). Le motif YENPTY est compris dans la partie C-terminale au niveau des résidus 757 à 762 d'APP₇₇₀. La région A β est située du côté N-terminal du TMD. (Dawkins and Small, 2014)

Localisation et trafic subcellulaires d'APP

La localisation subcellulaire d'APP reste débattue, notamment parce qu'elle diffère selon le type cellulaire, d'où l'importance de bien considérer les modèles *in vitro* dans lesquels on évalue la fonction d'APP, et potentiellement la toxicité d'A β (Haass et al., 2012). APP est produite dans la voie de sécrétion et adressée à la membrane plasmique. On la trouve aussi après internalisation dans les compartiments intracellulaires endocytiques et lysosomaux

(Weidemann et al., 1989). Au cours de sa maturation dans le réseau trans-golgien (TGN), APP subit différentes modifications post-traductionnelles complexes telles que des sulfatations, des N- et O- glycosylations et des phosphorylations (Griffith et al., 1995). La proportion d'APP présente à la membrane n'est pas claire. Dans les cellules non polarisées, APP serait majoritairement présente au niveau de l'appareil de Golgi et du TGN. Il est estimé d'après des cultures de cellules surexprimant APP qu'environ 10 % de l'APP produit atteint la membrane, et que ceux-ci sont internalisés via le motif YENPTY au bout de quelques minutes seulement (Lai et al., 1995; Marquez-Sterling et al., 1997). Dans les neurones, l'adressage d'APP est plus difficile à décrire de par la segmentation des différents sous-compartiments neuronaux. APP est détectée dans le soma, les dendrites et surtout les axones. Dans les axones, APP est transportée le long des microtubules selon un transport antérograde rapide (Koo et al., 1990; Sisodia et al., 1993). La séquence responsable de cet adressage axonal n'est pas déterminée, voire inexistante. En effet, un mutant APP dépourvu de sa partie C-terminale (APP Δ C) est transporté aux axones de la même manière qu'APP sauvage (Back et al., 2007). Il apparaît crucial de mieux comprendre ce système d'adressage, d'une part car les neurones sont la source principale de synthèse d'A β , et d'autre part car la protéolyse d'APP est dépendante de sa localisation subcellulaire (De Vos et al., 2008; Morfini et al., 2009). Le fait qu'APP soit préférentiellement présente dans les axones suggère une fonction importante dans la transmission post-synaptique qui reste à ce jour non-élucidée.

Traitement protéolytique d'APP

APP peut être protéolysée selon deux voies de maturation distinctes et mutuellement exclusives (Figure 4) : la voie non-amyloïdogénique, constituée de clivages séquentiels par les α - et γ -sécrétases ; et la voie amyloïdogénique composée des clivages successifs par les β - et γ -sécrétases. Les coupures α et β sont les étapes limitantes dans ces voies de protéolyse.

La voie non-amyloïdogénique. La voie de maturation principale dite non-amyloïdogénique est initiée par le clivage par l' α -sécrétase à la surface cellulaire (Figure 5), entre les résidus 687 et 688 dans le domaine A β (Lammich et al., 1999; Anderson et al., 1992), ce qui empêche la formation du peptide amyloïde et donne son nom à cette voie de protéolyse. La coupure α libère un grand fragment N-terminal sAPP α qui est sécrété, et un fragment C-terminal (CTF) de 83 résidus (C83) qui reste ancré à la membrane. C83 est ensuite clivé par le complexe γ -sécrétase libérant un petit peptide P3 extracellulaire (Haass et al., 1993), et le domaine intracellulaire nommé AICD (APP IntraCellular Domain).

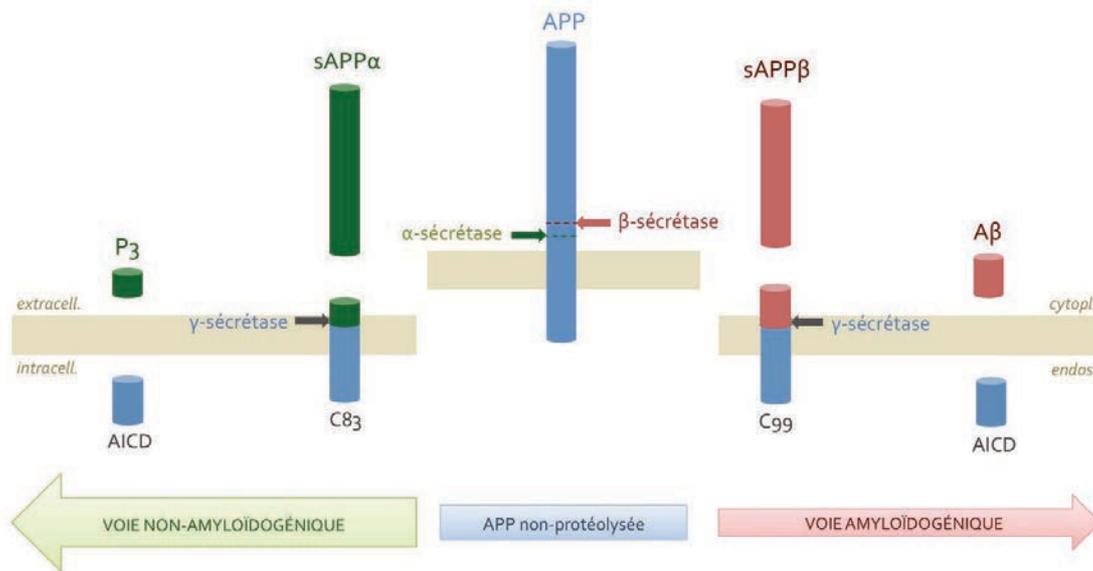


Figure 4. Les deux voies de protéolyse d'APP.

APP subit deux voies de maturation exclusives. La voie non-amyloïdogénique permet, par clivages successifs par les α - et γ -sécrétases, la sécrétion d'un grand fragment sAPP α , du peptide P3 et de la partie intracellulaire AICD. La voie amyloïdogénique permet, par les clivages des β - et γ -sécrétases, de libérer un fragment sAPP β sécrété, le peptide A β et un fragment AICD.

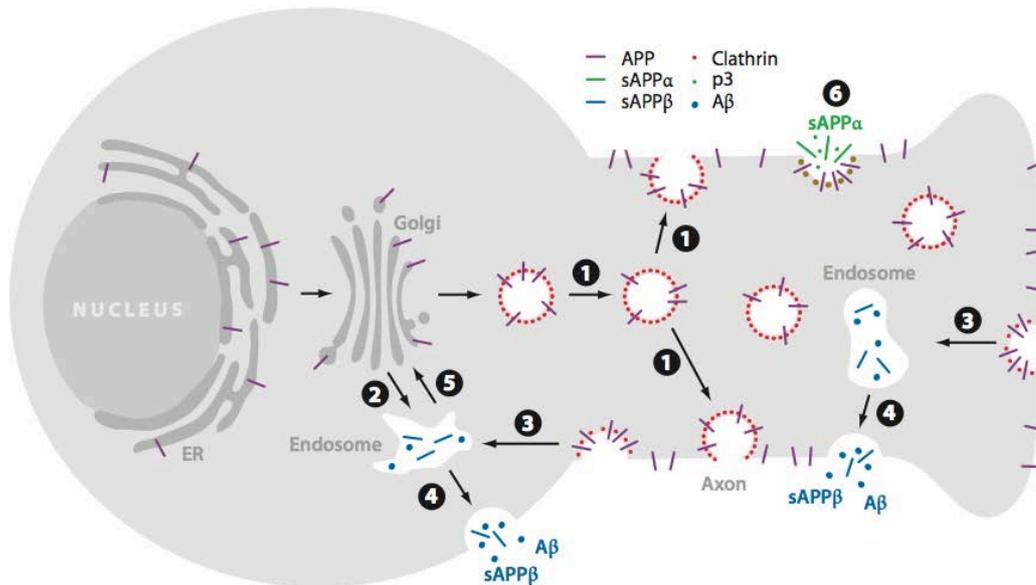


Figure 5. Transport et localisation des étapes de maturation d'APP dans un neurone.

L'APP nouvellement synthétisée (violet) est adressée depuis l'appareil de Golgi vers l'axone (1) ou vers un endosome au niveau du corps cellulaire (2). Après son insertion à la membrane plasmique, APP peut être clivée par l' α -sécrétase (6), libérant ainsi les fragments soluble sAPP α et P3 (vert), ou être réinternalisée de façon clathrine-dépendante vers un endosome où peut agir la β -sécrétase (3). Les produits de protéolyse sAPP β et A β (bleu) sont sécrétés par fusion de l'endosome avec la membrane plasmique (4). Le retour d'endosome contenant de l'APP non-protéolysée vers l'appareil de Golgi est médié par les retromères (5). (O'Brien and Wong, 2011)

La voie amyloïdogénique. La voie amyloïdogénique est une voie de clivage minoritaire (du moins en conditions non pathologiques) qui conduit à la génération des peptides A β (Anderson et al., 1992). La β -sécrétase clive APP entre les résidus 671 et 672 (Sissodia et al., 1990), ce qui conduit à la sécrétion d'un fragment N-terminal sAPP β plus petit que sAPP α . Le CTF résiduel, C99, est clivé par la γ -sécrétase, libérant le peptide A β , qui peut être sécrété, et un autre AICD.

L' α -sécrétase. Les enzymes identifiées pour leur activité α -sécrétase appartiennent toutes à la famille des ADAM (A Disintegrin And Metalloprotease) (Allinson et al., 2003; Asai et al., 2003). Les ADAM sont des protéases transmembranaires contenant un domaine de type disintégrine et un domaine liant le Zn²⁺ (Schlöndorff and Blobel, 1999). ADAM10, la principale α -sécrétase neuronale (Kuhn et al., 2010), est aussi responsable, parmi d'autres, du clivage de Notch et des cadhérines (Vingtdeux and Marambaud, 2012). Augmenter l'activité α -sécrétase dans des modèles animaux de la MA ou dans des cultures de cellules diminue la production d'A β (Postina et al., 2004). L' α -sécrétase a donc été considérée comme un cible thérapeutique potentielle pour le traitement de la MA (Fahrenholz, 2007). Néanmoins, cette stratégie est limitée par la présence de ses autres substrats.

De façon intéressante, la perte de la fonction α -sécrétase génère un modèle de la forme sporadique de la MA (Epis et al., 2010). Ce modèle non transgénique repose sur l'administration de la synapse-associated protein 97 qui intervient dans l'adressage d'ADAM10 à la synapse. Ce modèle suggère qu'une altération de l'activité α -sécrétase pourrait être impliquée dans le développement de la MA.

La β -sécrétase. La clivage par la β -sécrétase a lieu principalement dans les endosomes et lysosomes (Vassar et al., 1999; Huse et al., 2000). Deux β -sécrétases ont été identifiées et nommées BACE1 et 2 (Beta-site APP Cleaving Enzyme), ce sont des protéases à aspartate de la famille des pepsines incluses dans la membrane (Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Acquati et al., 2000; Farzan et al., 2000). L'activité β -sécrétase de BACE2 n'a cependant pas été confirmée *in vivo*. BACE1 possède, en plus d'APP, plusieurs substrats parmi lesquels les récepteurs des lipoprotéines (von Arnim et al., 2005), les sous-unités β des canaux sodiques voltage-dépendants (Wong et al., 2005) et la neuréguline (Willem et al., 2006). BACE1 a été impliquée dans la myélinisation des axones du système nerveux périphérique (Willem et al., 2006), mais son rôle dans le système nerveux central reste débattu. Parce que la coupure β est l'étape limitante dans la production d'A β , et que diminuer son activité a pour effet d'inhiber

la production d'A β *in vitro* et *in vivo*, BACE1 est une cible thérapeutique majeure pour le traitement de la MA (Citron, 2004).

La γ -sécrétase. Le clivage par la γ -sécrétase peut avoir lieu dans tous les compartiments cellulaires. La γ -sécrétase, incluse dans la membrane lipidique, est un complexe multi-protéique de haut poids moléculaire composé de PS1 ou PS2, d'une glycoprotéine de type I, la nicastrine et de deux protéines membranaires, APH-1 (Anterior PHarynx-defective 1) et PEN-2 (Presenilin ENhancer 2) (Wolfe et al., 1999; Francis et al., 2002; Steiner et al., 2002). Plusieurs étapes sont nécessaires à l'assemblage et la maturation du complexe dans le réticulum endoplasmique. PS1 et PS2 sont des protéines à huit domaines transmembranaires. Elles sont activées par un processus d'auto-protéolyse qui sépare les fragments N- et C-terminaux qui s'assemblent ensuite pour former des hétérodimères (Levitan et al., 2001). Le complexe est stabilisé, adressé par la nicastrine, et APH-1 participe à la formation du complexe γ et à son activité catalytique. Bien que moduler l'activité de la γ -sécrétase permette de contrôler la production d'A β , ses nombreux substrats en font une mauvaise cible thérapeutique (Wolfe, 2012a).

Hétérogénéité des espèces A β . Contrairement aux α - et β -sécrétases, la γ -sécrétase ne clive pas APP en un site unique mais en différents sites adjacents inclus dans la membrane plasmique (Figure 6) (Wolfe, 2012b). Ceci conduit à une hétérogénéité C-terminale des peptides P3 et A β , ainsi qu'une hétérogénéité de l'extrémité N-terminale. Les peptides A β peuvent être composés de 39 à 43 acides aminés, A β 40 étant l'espèce majoritaire et A β 42 la seconde (Seubert et al., 1992). En regard, l'AICD comporte majoritairement 57 ou 59 résidus (C57 ou C59). La longueur du peptide A β modifie ses propriétés d'agrégation. A β 42, plus hydrophobe, est plus prompt à oligomériser et former des fibrilles amyloïdes (Burdick et al., 1992; Jarrett et al., 1993). Les mutations des gènes PS1 et PS2 associées aux formes familiales de la MA affectent les propriétés catalytiques de la γ -sécrétase, favorisant le plus souvent la production du peptide A β 42 (Borchelt et al., 1996; Duff et al., 1996; Citron et al., 1997; et pour revue, Larner, 2013).

Equilibre entre les deux voies de maturation. Si la balance exacte entre les deux voies de maturation d'APP n'est pas définie, la voie non-amyloïdogénique semble être largement majoritaire en conditions « normales ». La surproduction pathologique d'A β pourrait être liée à une dérégulation de la protéolyse d'APP. De ce déséquilibre résulterait à la fois une surproduction d'A β , et une diminution des espèces issues de la voie non-amyloïdogénique. Les deux événements étant conjoints, il est difficile de faire la part des choses entre un gain de

toxicité lié à l'augmentation de la voie amyloïdogénique, et une potentielle perte de fonction résultant de la diminution de la voie non-amyloïdogénique ; et de leurs implications potentielles respectives dans les mécanismes sous-jacents l'apparition de la MA.

L'engagement d'APP dans l'une ou l'autre de ses voies de protéolyse est dépendant de sa localisation subcellulaire et peut être modulé par l'activation de nombreux récepteurs tels que le récepteur sérotoninergique 5-HT₄, les récepteurs métabotropiques du glutamate, les récepteurs muscariniques et les récepteurs du facteur de croissance. Il peut aussi être influencé par plusieurs kinases, y compris les kinases A et C, la GTPase Rac, l'AMP cyclique (AMPC), ou encore le niveau de calcium intracellulaire (Gandy and Greengard, 1994). Parmi les composés qui augmentent l'activité α -sécrétase, l'on peut citer le peptide PACAP (Pituitary Adenylyl-Cyclase Activating Peptide) (Kojro et al., 2006). La plupart de ces composés sont connus pour participer à la mise en place de la mémoire, ce qui suggère donc que la protéolyse d'APP pourrait être régulée au cours des processus mnésiques.

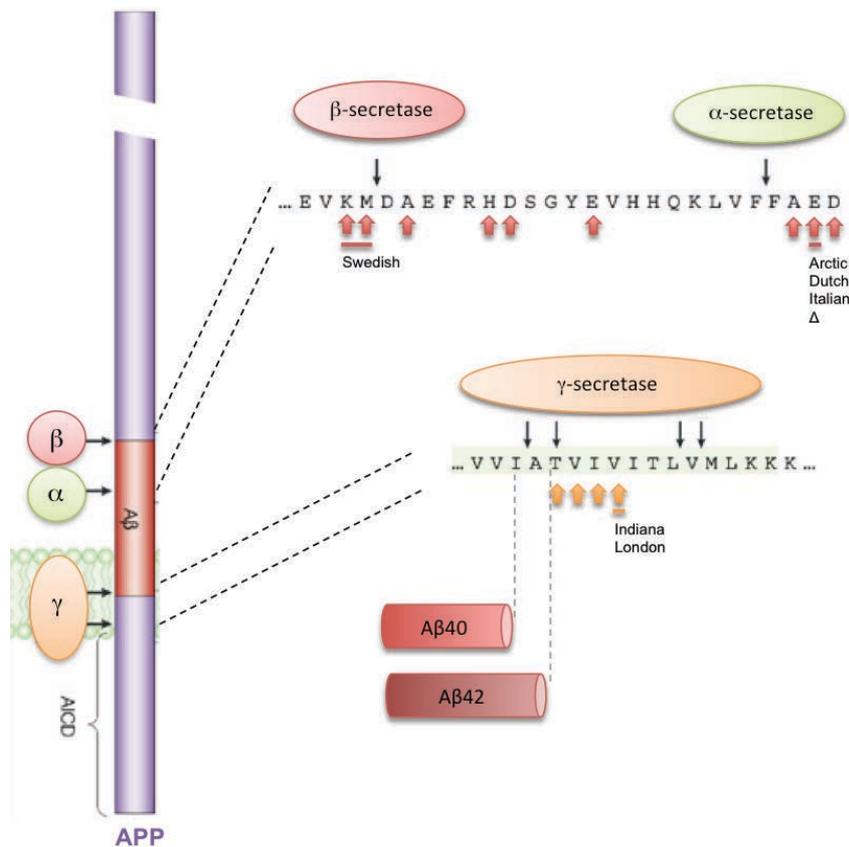


Figure 6. Sites de clivage des sécrétases et mutations du gène APP associées.

Les mutations liées aux formes héréditaires de la MA sur le gène APP surviennent autour des sites de clivage protéolytique. Les sites des mutations ponctuelles sont représentés par des flèches. Les mutations les plus couramment utilisées dans les modèles de la MA sont soulignées, et leurs noms sont précisés. La multiplicité des sites de clivages de la γ -sécrétase conduit à une hétérogénéité des peptides A β . A β 40 et A β 42 sont les deux espèces majoritaires.

Fonction d'APP et de ses métabolites

APP a été impliquée dans de nombreux processus physiologiques tels que la neurogénèse et la synaptogenèse, la croissance des neurites, le transport axonal, la prolifération, l'adhérence et la migration cellulaire, ou encore l'homéostasie du glucose (Zheng and Koo, 2011), mais sa fonction exacte reste incomprise. Comme nous l'avons mentionné plus haut, en plus d'une redondance fonctionnelle, l'étude de la fonction d'APP est compliquée par la présence de nombreux métabolites dérivés localisés dans des compartiments subcellulaires ou extracellulaires distincts (Figure 7).

APP non-protéolysée. La structure d'APP prédit une fonction de récepteur transmembranaire (Kang et al., 1987). Cependant la démonstration formelle d'une telle fonction n'a pas été apportée et aucun ligand n'a été validé à ce jour. Lorsqu'APP est présente à la membrane plasmique, elle peut former des homodimères en *trans* ou *cis*, qui participent aux interactions cellule à cellule et à la liaison à la matrice extracellulaire (Scheuermann et al., 2001). APP se lie à plusieurs composants de la matrice extracellulaire, tels que le collagène et l'héparine ou encore la laminine et les intégrines (Small et al., 1992; Behr et al., 1996). APP participerait aussi à la synaptogenèse en stabilisant l'interaction entre neurones (Baumkötter et al., 2012). Le domaine E1 a été impliqué biochimiquement dans ces dimérisations (Soba et al., 2005), tandis que l'implication du domaine E2 n'a été mise en évidence que par cristallisation (Wang and Ha, 2004). En présence d'héparine, le transdimère APP formé via le domaine E2 pourrait permettre de rapprocher des cellules à moins de 10 nm de distance. Cette interaction serait donc plutôt dédiée à établir des contacts entre cellules adjacentes, par exemple pour la formation de jonctions de type communicantes (Gralle et al., 2006). Chez la souris, APP forme des hétérodimères avec des protéines homologues que l'on peut détecter aussi dans le compartiment intracellulaire (Soba et al., 2005).

Formes sécrétées. Les grands fragments N-terminaux sAPP α et sAPP β diffèrent seulement de 16 acides aminés, mais ils présentent des fonctions très différentes. Cela pourrait en partie s'expliquer par le fait que sAPP α conserve deux sites de liaison à l'héparine, contrairement à sAPP β qui n'en contient qu'un seul. sAPP α présente des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices, qui sont environ 100 fois supérieures à celles de sAPP β dans des cellules en culture (Furukawa et al., 1996; Gralle et al., 2009; Copanaki et al., 2010). sAPP α peut induire la rupture des dimères d'APP, mais la fonction de ce mécanisme n'est pas définie. Dans les cellules polarisées non-neuronales, sAPP α semble posséder son propre signal d'adressage vers le milieu extracellulaire (De Strooper et al., 1995; Haass et al., 1995).

D'un point de vue fonctionnel, sAPP α est bénéfique pour la mémoire, et l'injection de sérums sAPP α peut même augmenter les performances mnésiques chez la souris (Meziane et al., 1998; Bour et al., 2004; Taylor et al., 2008). sAPP β en revanche montre des propriétés pro-apoptotiques. La partie N-terminale de sAPP β , libérée après un clivage supplémentaire non caractérisé, peut activer le récepteur DR6 (Death Receptor 6). Ce mécanisme permet soit de résorber sélectivement les axones en croissance via la caspase 6, soit d'induire une mort neuronale via la caspase 3 (Nikolaev et al., 2009).

Le peptide P3 n'a pas ou peu de fonctions connues, il serait éventuellement neuroprotecteur (Dulin et al., 2008; Han et al., 2011).

En conditions physiologiques, le peptide A β module la transmission synaptique (Morley and Farr, 2014). Selon la règle de l'hormèse propre à de nombreux neurotransmetteurs ; A β est bénéfique pour la mémoire à une concentration de l'ordre du picomolaire, tandis qu'il lui est délétère à des concentrations plus élevées.

L'augmentation de la quantité de peptides A β peut provenir d'une augmentation de sa synthèse, via une augmentation de la voie amyloïdogénique, et également d'une diminution de sa dégradation. En effet, comme de nombreux neuropeptides, les peptides A β sont dégradés par des neuropeptidases transmembranaires. Il a été montré que l'activité des Néprilysines, principales enzymes impliquées dans la dégradation des peptides amyloïdes (Iwata et al., 2001), décroît avec l'âge et chez les patients atteints de la MA (Huang et al., 2012).

En conditions pathologiques, les peptides A β , selon leur taille et leur concentration, s'agrègent en oligomères puis en fibrilles qui elles-même forment les plaques amyloïdes. L'espèce A β 42 est plus prompte à s'agréger qu'A β 40, ce qui a été corrélé à une plus forte neurotoxicité. La toxicité d'A β varie en fonction du type cellulaire, et de la taille des oligomères (Ono et al., 2009). Les formes dimériques et trimériques sont les plus toxiques, induisant des dysfonctions cellulaires sévères (Sakono and Zako, 2010), altérant la plasticité synaptique (Klyubin et al., 2008; Selkoe, 2008) et plus particulièrement la potentialisation à long terme (LTP), la plasticité neuronale majeure pour les processus mnésiques.

Domaine intracellulaire. L'AICD peut former un complexe avec Fe65 et être ainsi transporté au noyau et réguler l'expression de gènes (Kimberly et al., 2001; Cao and Südhof, 2004; von Rotz et al., 2004). Il semble que selon la voie de maturation par laquelle il est produit, l'AICD ait des fonctions différents (Goodger et al., 2009; Pardossi-Piquard and Checler, 2012). L'AICD peut induire des voies pro-apoptotiques (Ohkawara et al., 2011), via

la transactivation du promoteur p53 (Alves da Costa et al., 2006). L'AICD augmente également l'expression des Néprilysines (Pardossi-Piquard et al., 2005). La fonction d'activateur de transcription de l'AICD a longtemps été débattue, notamment à cause de sa demi-vie très courte, et du fait que ses cibles soient dépendantes du type cellulaire étudié. Il a également été proposé que l'AICD puisse réguler le niveau de calcium intracellulaire (Hamid et al., 2007).

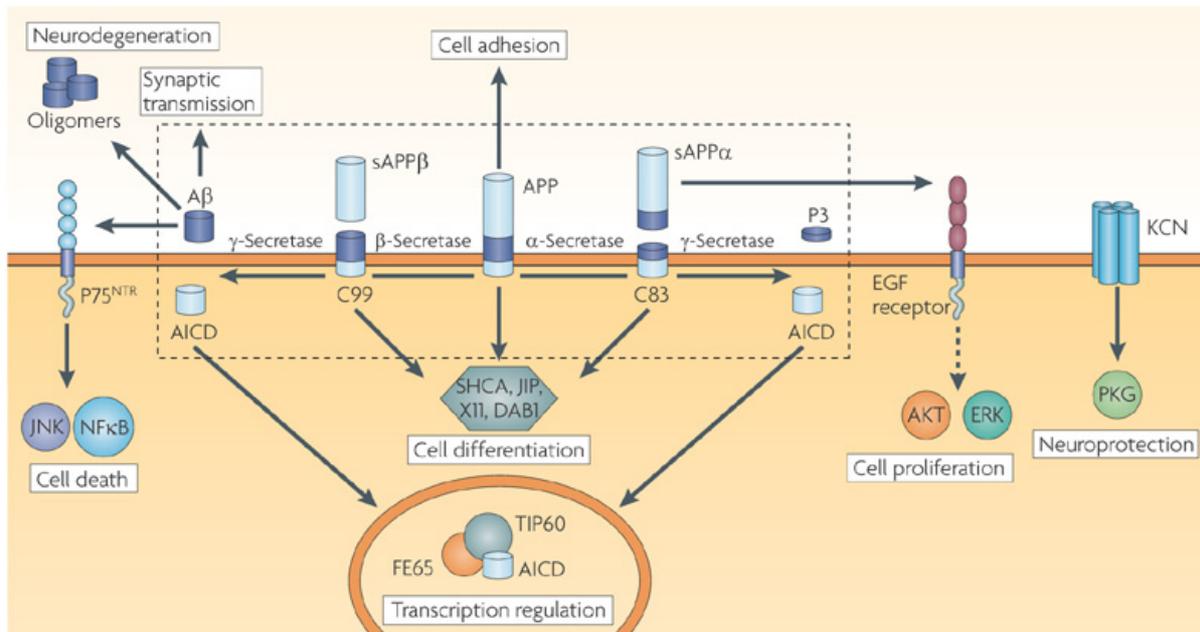


Figure 7. Exemples des fonctions cellulaires auxquelles participent les métabolites d'APP.

Malgré sa structure de récepteur membranaire, un tel rôle n'a pas été démontré pour la forme non-protéolysée d'APP qui pourrait jouer un rôle dans l'adhésion cellulaire. Le fragment sAPPα est neurotrophique et neuroprotecteur, il pourrait favoriser la prolifération via le récepteur de facteur de croissance (epidermal growth factor EGF), et la survie cellulaire en activant directement ou indirectement des canaux potassiques KCN qui protègent contre l'excitotoxicité. Le peptide amyloïde module la transmission synaptique, forme des oligomères et des plaques neurotoxiques, et tout comme sAPPβ peut activer des voies pro-apoptotiques. Les fragments CTFs interagissent avec de nombreuses molécules de signalisation qui contrôlent des voies de différenciation cellulaires. Enfin, l'AICD peut agir comme un activateur de transcription avec l'adaptateur Fe65. (Willnow et al., 2010)

Homologues d'APP

APP appartient à une grande famille génique conservée au cours de l'évolution. Chez les mammifères, trois homologues sont présents : APP, et les APP-like APLP1 et APLP2. La drosophile possède un unique orthologue APPL (Rosen et al., 1989), le nématode APL-1 (Daigle and Li, 1993) et le poisson-zèbre, APPb (Joshi et al., 2009). Les protéines de la famille d'APP partagent la même structure, avec une forte homologie au niveau des domaines

extracellulaires E1 et E2 et du domaine intracellulaire. En revanche, la séquence A β n'est pas conservée chez ces homologues (Muller and Zheng, 2012). Des homologues des trois sécrétases α , β et γ ont été identifiés chez la souris et la drosophile, ce qui suggère que les deux voies de protéolyse sont conservées chez ces organismes (Poeck et al., 2012). De plus, il existe une complémentarité inter-espèces entre les protéines de la famille APP, ainsi qu'entre leurs sécrétases : pour exemple, l'APP humain sauve les déficits induits par la perte d'APPL chez la drosophile (Luo et al., 1992), et les sécrétases de la mouche peuvent cliver l'APP humain et inversement (Greeve et al., 2004; Carmine-Simmen et al., 2009).

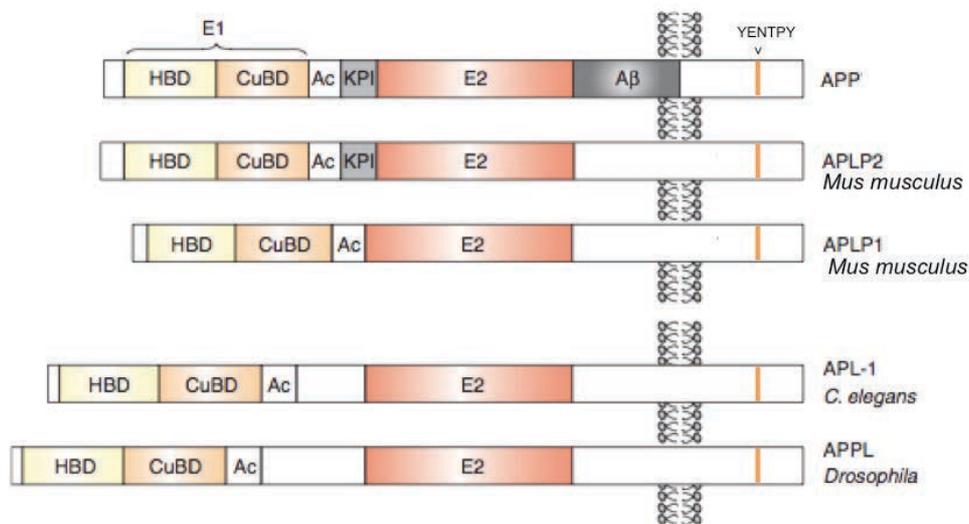


Figure 8. Comparaison des séquences protéiques des homologues de la famille APP.

Les homologues d'APP chez la souris, le nématode et la drosophile montrent une forte conservation des domaines E1 et E2 dans la partie extracellulaire, et du domaine intracellulaire qui contient un site de fixation aux protéines G et une séquence d'internalisation YENTPY. La séquence A β est spécifique d'APP humaine (Muller and Zheng, 2012).

Modèles animaux

Très peu d'espèces développent spontanément une pathologie amyloïde. Seuls les chiens, les chats, les ours, les chèvres, les moutons, le carcajou et plusieurs primates non-humains comme le microcèbe ont été répertoriés. Chez ces organismes, la présence de plaques pourrait être également associée à des déficits cognitifs (Van Dam and De Deyn, 2011). Chez les rongeurs, la présence de plaques amyloïdes et de DNF n'a été signalée qu'une fois chez *Octodon degus* (Tarragon et al., 2013).

En revanche, les espèces modèles utilisées en biologie, chez qui la séquence A β n'est pas conservée, ne développent pas naturellement de plaques amyloïdes. L'étude de la MA

chez ces espèces repose donc sur la surexpression artificielle des séquences humaines codant A β , APP ou tau. Le ver *Caenorhabditis elegans* n'a été utilisé que pour attester l'effet de la surexpression d'A β humain : celle-ci induit une déposition amyloïde dans les neurones, et une paralysie au niveau des cellules musculaires. (Li and Le, 2013). Chez le poisson-zèbre, aucun modèle amyloïdogénique n'est disponible ; mais la surexpression de la protéine tau mutée (P301L) a permis d'observer des DNF et des déficits comportementaux (Paquet et al., 2009). Chez la drosophile, plusieurs études ont été menées que nous détaillerons dans le chapitre suivant. La souris, quant à elle, a été largement employée pour générer des modèles transgéniques capables de reproduire les caractéristiques histologiques de la MA (Duyckaerts et al., 2007).

Modèles murins transgéniques amyloïdogéniques

Simples mutants APP. La surexpression du gène APP murin chez la souris ne cause pas de déposition amyloïde, et celle du gène humain sauvage n'induit qu'une déposition très limitée (Jankowsky et al., 2007). Il faut donc utiliser des formes mutées d'APP pour reproduire de manière robuste la pathologie de la MA. Voici les principales mutations APP utilisées :

- la mutation Swedish (APP_{swe}), la plus utilisée, est une double substitution (K670N/M671L) localisée au niveau du site de clivage de la β -sécrétase et qui entraîne une augmentation du clivage par BACE1 et donc de la production d'A β , aussi bien de l'espèce A β 40 qu'A β 42 (Borchelt et al., 1996; Hsiao et al., 1996; Sturchler-Pierrat et al., 1997)
- les mutations London (V717I) et Indiana (V717F) sont localisées au niveau du site de clivage de la γ -sécrétase et favorisent la production d'A β 42 (Suzuki et al., 1994; Games et al., 1995).
- les mutations Dutch (E693Q) et Arctic (E693G), situées dans le domaine A β , augmentent la fibrillogénèse du peptide ou sa résistance à la protéolyse (Nilsberth et al., 2001; Herzog et al., 2004; Lord et al., 2006).

Les souris transgéniques exprimant l'une ou l'autre de ces formes mutées d'APP reproduisent plusieurs phénotypes de la MA : la présence de plaques amyloïdes compactes et diffuses, des déficits cognitifs et comportementaux liés à l'âge, une angiopathie amyloïde, et une astrogliose caractéristique d'une inflammation. Toutefois, deux éléments essentiels manquent : les DNF sont absents (alors même que la forme tau hyperphosphorylée est présente), et la perte neuronale reste limitée (Van Dam and De Deyn, 2011). Ainsi, ces

modèles suggèrent qu'il n'existe pas de lien causal simple entre A β , DNF et neurodégénérescence, ou bien que la surexpression d'APP ne permet pas de reproduire la cascade moléculaire pathologique de la MA chez l'animal (Duyckaerts et al., 2007).

Mutants APP-PS1. Les modèles transgéniques générés à partir d'une séquence PS1 mutée ne présentent pas de phénotype particulier, alors même que le niveau d'A β endogène est augmenté (Oyama et al., 1998; Sawamura et al., 2000; Mattson et al., 2001). Les séquences des protéines APP humaine et de souris ne diffèrent que de 17 acides aminés, dont 3 sont situés au niveau de la région A β , ce qui suggère que l'un de ces trois acides aminés est essentiel pour l'agrégation du peptide amyloïde. La surexpression conjointe de séquences APP et PS1 mutées permet d'induire une pathologie amyloïde plus sévère que les simples mutants APP, et une perte neuronale, ce qui a été attribué à l'augmentation du rapport A β 42/A β 40 (Duff et al., 1996; Holcomb et al., 1998; McGowan et al., 1999; Garcia-Alloza et al., 2006...; McGowan et al., 2006).

Triple mutant APP/PS1/tau. A ce jour, le modèle murin qui permet de se rapprocher au mieux de la signature histologique de la MA est la souris triple transgénique 3xTg exprimant les gènes humains APP_{sw}/PS1(M146V)/tau(P301L). Ce modèle présente des plaques amyloïdes, des DNF, une perte neuronale, une astrogliose, ainsi que des dysfonctionnements synaptiques et une diminution de la LTP liés à l'âge (Oddo et al., 2003). Chez ces souris 3xTg, la déposition amyloïde est antérieure à la formation des DNF, ce qui suggère qu'A β agit en amont de tau dans la MA. Cette observation est en accord avec l'absence de mutation tau reliée à la maladie.

Des phénotypes artificiels liés à la surexpression d'APP ? L'analyse biochimique des dépôts amyloïdes formés chez ces modèles murins a révélé qu'ils diffèrent chimiquement des dépôts amyloïdes humains. Les agrégats A β trouvés chez la souris sont solubilisables dans des tampons contenant du SDS, et ils contiennent des fragments CTF (C99 et C83) bien plus abondants que chez l'homme (Kuo et al., 2001; Kalback et al., 2002). Il a été suggéré que plusieurs des phénotypes observés chez les modèles souris soient artificiels, causés par la présence d'APP en excès. Afin de se départir de ces phénotypes artificiels, un nouveau modèle a été proposé. Des souris générées à partir d'une séquence APP portant la combinaison des mutations Swedish, Beyreuther/Iberian et Arctic, permettraient, d'après les auteurs, d'induire la surproduction d'A β sans celle d'APP. Ces souris présentent des dépôts amyloïdes, une inflammation, et des défauts mnésiques liés à l'âge, mais pas de DNF (Saito et al., 2014).

Surexpression d'A β . Une autre alternative pour éviter les phénotypes liés à la surexpression d'APP est d'exprimer directement des séquences A β . L'expression de peptides A β 42 dépourvus de peptide signal (LaFerla et al., 1995) induit leur accumulation dans le compartiment intracellulaire, ce qui conduit à la dégénérescence des neurones, active une réponse inflammatoire gliale, mais n'entraîne ni déposition amyloïde ni formation de DNF. L'expression d'une séquence A β 42 fusionnée à la protéine BRI, afin de permettre sa sécrétion, induit la formation de plaques amyloïdes (Lewis et al., 2001), contrairement à celle d'A β 40. Ces résultats ont permis de montrer que la neurotoxicité du peptide amyloïde varie en fonction de sa longueur.

Les modèles en « perte de fonction » d'APP

Simple mutant APP. Les souris invalidées pour le gène APP sont viables et fertiles (Zheng et al., 1995). Elles présentent un certain nombre de défauts tels qu'un déficit global de croissance avec une taille et un poids diminués, une altération du développement cérébral, une vaste gliose réactive, des troubles de l'homéostasie du cuivre et des lipides, ainsi qu'une diminution des capacités d'apprentissage et de mémorisation (Zheng et al., 1995; Dawson et al., 1999; Seabrook et al., 1999).

Double et triple mutants APP. Les souris double knock-out (KO) APP^{-/-}; APLP1^{-/-} sont viables tandis que les doubles KO APP^{-/-}; APLP2^{-/-} et APLP1^{-/-}; APLP2^{-/-} présentent une létalité importante (Heber et al., 2000). Les souris triplement invalidées ne survivent pas (Herms et al., 2004). Ces modèles KO démontrent qu'il existe une redondance fonctionnelle non égale entre les trois homologues APP mammifères (Anliker and Müller, 2006) et qu'il est impossible d'étudier la perte de fonction totale chez la souris. Les études menées avec des souris simple KO peuvent être biaisées par la présence des deux autres homologues, qui peuvent potentiellement compenser la perte du gène invalidé dans la fonction étudiée.

Déficits cognitifs des modèles transgéniques murins de la MA

L'aspect cognitif le plus évalué chez les modèles murins de la MA est en toute logique la mémoire. Le labyrinthe aquatique (Morris Water Maze) qui évalue la mémoire spatiale est le paradigme le plus employé, suivent la tâche de reconnaissance d'objets (Novel Object Recognition) qui mesure les capacités d'exploration, d'alternance et de rétention d'informations et les T- et Y- mazes pour la mémoire de travail. Toutes ces mémoires sont affectées chez les modèles de la MA. Des déficits de mémoire associative, aversive ou attractive, sont aussi rapportés (pour références, cf. Table 1). Ces paradigmes ont aussi permis

de mettre en exergue une hyperactivité locomotrice chez la plupart de ces modèles, réminiscence de l'hyperactivité observée chez les patients dans les phases précoces de la MA.

La mémoire olfactive a été relativement peu étudiée chez la souris, et ce, malgré le fait que l'altération de l'olfaction soit l'un des primo-symptômes de la maladie observé chez l'homme. Une explication est le fait que la discrimination olfactive est un paramètre très robuste chez la souris, et qu'en conséquence, s'il est possible d'estimer des aspects fins de l'olfaction (niveau de discrimination, temps de réaction), son étude n'est pas adaptée à la mesure de la mémoire. Les souris Tg2576 présentent un déficit de mémoire olfactive à court-terme alors que la détection des odeurs est préservée (Guérin et al., 2009; Wesson et al., 2010). Dans un test associatif où la récompense est délivrée lors de la présentation d'une nouvelle odeur tandis que les odeurs présentées dans les essais précédents s'accumulent dans l'enceinte expérimentale, les souris Tg2576 présentent un déficit à partir de huit odeurs à retenir (Young et al., 2009).

Apports et limites des modèles murins

Les modèles animaux de la MA ont contribué à établir un lien entre les deux lésions cérébrales de la maladie en suggérant 1) qu'A β agisse en aval de tau, et 2) que tau soit un aggravateur d'une pathologie amyloïde. Ils ont aussi permis dans un premier temps de mettre en évidence une corrélation entre dépôts amyloïdes et déficits mnésiques. Cependant, ces déficits pourraient être antérieurs à la déposition amyloïde ce qui a remis en question le lien causal entre la présence des plaques amyloïdes et le dysfonctionnement de la mémoire, et a conduit à proposer que les peptides A β soient toxiques avant leur agrégation.

Néanmoins, la fiabilité de ces données peut être contestée par la difficulté de reproduire de manière fiable une pathologie amyloïde chez l'animal. En effet, 1) l'absence de DNF ou de perte neuronale chez les simples mutants APP, 2) le fait qu'il faille associer une surexpression de tau mutée à celle d'APP pour induire la formation des DNF, et 3) que la répartition cérébrale des lésions ne corresponde pas celle de la MA (Götz and Ittner, 2008) montrent que les mécanismes neurotoxiques observés dans ces modèles ne sont pas identiques à ceux mis en jeu chez l'homme.

En synthèse, ces modèles souris sont limités car :

- la physiologie de la souris semble être inappropriée au développement d'une telle pathologie car il est impossible d'induire une pathologie amyloïde par la surexpression de protéines endogènes (Jankowsky et al., 2007),

Reference	AD model	Ob Re	Loc	Sp mem	W mem	A cond	Disc	Hab	Sp alt
(Tagliatela et al., 2009)	Tg2576	-				-			
(Deacon et al., 2009)	Tg2576		+					-	
(Mouri et al., 2007)	Tg2576			-		-			
(Quinn et al., 2007)	Tg2576			-		-			
(Dineley, 2007)	Tg2576					-			
(Zhuo et al., 2007)	Tg2576			0	0		-		
(Tsai et al., 2007)	Tg2576			-					
(Choi et al., 2007)	Tg2576			-		-			
(Gil-Bea et al., 2007)	Tg2576		+						
(Jacobsen et al., 2006)	Tg2576					-			
(Ohno et al., 2006)	Tg2576					-			
(Comery et al., 2005)	Tg2576					-			
(Ognibene et al., 2005)	Tg2576	-	+	-					
(Dong et al., 2005)	Tg2576			-		-			
(Barnes et al., 2004)	Tg2576				-		0		-
(Middei et al., 2004)	Tg2576			-		-			
(Lalonde et al., 2003)	Tg2576		+						-
(Stackman et al., 2003)	Tg2576			-					
(Corcoran et al., 2002)	Tg2576					-/0	0		-
(Kotilinek et al., 2002)	Tg2576			-					
(King and Arendash, 2002)	Tg2576	-	+	0		-			
(Westerman et al., 2002)	Tg2576			-					
(King et al., 1999)	Tg2576		+	-		-			
(Hsiao et al., 1996)	Tg2576		+	-					
(Westerman et al., 2002)	Tg2576			-					
(Jardanhazi-Kurutz et al., 2010)	APP/PS1			-					
(Cotel et al., 2010)	APP/PS1		+		-				
(Filali et al., 2009)	APP/PS1					-	-		-
(Pugh et al., 2007)	APP/PS1		-						
(Costa et al., 2007)	APP/PS1	-		-	-				
(Arendash et al., 2006)	APP/PS1	-		-					
(Sadowski et al., 2004)	APP/PS1			-					
(Howlett et al., 2004)	APP/PS1	-							
(Trinchese et al., 2004)	APP/PS1				-				
(Arendash et al., 2001)	APP/PS1		+	-					0
(Holcomb et al., 1999)	APP/PS1		+	-					
(Wirhth et al., 2008)	APP/PS1 ki				-				-
(Faure et al., 2009)	APP/PS1 ki		+	-					
(Hanna et al., 2009)	Tg CRND8			-		-			
(Gortz et al., 2008)	Tg CRND8			-					
(Lovasic et al., 2005)	Tg CRND8			-					
(Chishti et al., 2001)	Tg CRND8			-					
(Janus et al., 2000)	Tg CRND8			-					
(Adriani et al., 2006)	APPswe		+	-					
(Savonenko et al., 2003)	APPswe				0				
(Chapman et al., 1999)	APPswe				-				
(King et al., 1999)	APPswe		+	-					
(Kelly et al., 2003)	APP23			-	-	-			
(Van Dam et al., 2003)	APP23		+	-					
(Lalonde et al., 2002)	APP23		-	-					
(Huitron-Resendiz et al., 2002)	PDAPP		+	-					
(Chen et al., 2000b)	PDAPP	0			-				
(Dodart et al., 1999)	PDAPP	-		-					
(Leighty et al., 2004)	PDAPP (4 lignées #)	-		-					
(Morgan et al., 2000)	PS1 Tg2576				-				
(Arendash et al., 1999)	PS1 Tg2576								0
(Holcomb et al., 1998)	PS1 Tg2576		+						-
(Blanchard et al., 2009)	aAPP751SL		+	-		-			
(Blanchard et al., 2008)	APP751SL			-					
(Rustay et al., 2010)	B6SJL		+			-			-
(Rustay et al., 2010)		129	+			-			-
(Richardson et al., 2003)	TAS10			-	-				
(Moran et al., 1995)	NSE-βAPP51			-					-
(Devi and Ohno, 2010)	5xFAD					-			
(Moechars et al., 1999)	APPWU4		+	-					
(Moechars et al., 1999)	APP/Ld/2		+	-					
(Wang et al., 2010a)	3xTgAD					-			
(Sterniczuk et al., 2010)	3xTgAD		-						

Table 1. Déficiences cognitives et comportementales chez les modèles murins de la MA.

Ob Re, reconnaissance d'objet ; Loc, activité locomotrice ; Sp mem, mémoire spatiale ; W mem, mémoire de travail ; A cond, conditionnement associatif ; Disc, discrimination ; Hab, habituation ; Sp Alt, alternance spontanée. (+) augmentation de l'activité locomotrice ; (-) diminution des performances ou de l'activité locomotrice ; (0) performances identiques aux contrôles. (Rey, 2010)

- en conséquence ces modèles reposent sur la surexpression de protéines humaines mutées qui semble induire certains phénotypes artificiels, comme le suggère la différence de composition des plaques amyloïdes chez la souris et chez l'homme (Kuo et al., 2001; Kalback et al., 2002),
- et, l'approche qui consisterait à étudier le rôle physiologique d'APP en analysant l'effet de sa perte de fonction est entravée par la présence de plusieurs homologues (Anliker and Müller, 2006). De plus, APP joue un rôle important au cours du développement et il serait donc nécessaire de disposer d'outils génétiques inductibles afin de pouvoir étudier son rôle physiologique chez l'adulte.

Nous verrons dans le chapitre suivant en quoi la drosophile constitue une alternative intéressante aux modèles mammifères. Il est possible d'une part, d'induire une pathologie amyloïde chez la mouche en surexprimant indifféremment la protéine APP humaine (Greeve et al., 2004), ou la protéine endogène APPL (Carmine-Simmen et al., 2009) et il est possible d'autre part d'étudier la perte de fonction d'APPL, qui est l'unique orthologue d'APP chez la mouche.

L'hypothèse amyloïde et sa remise en cause

L'hypothèse amyloïde, telle qu'elle fut formulée par Hardy et Higgins en 1992, propose que la fibrillogénèse d'A β soit l'événement initiateur de la MA, en provoquant une cascade de mécanismes pathogènes responsables de la formation des DNF, de la perte neuronale et de la démence (Hardy and Higgins, 1992) (Figure 8). L'hypothèse amyloïde a largement dominé la recherche des causes de la MA si bien que la plupart des études se sont concentrées sur la production, l'agrégation, et la dégradation du peptide amyloïde. Les approches thérapeutiques développées dans le cadre de cette hypothèse ont visé à diminuer la production du peptide en limitant la protéolyse d'APP, ou bien à empêcher la formation de plaques en limitant son agrégation. Les traitements chez l'animal par injection d'anticorps monoclonaux anti-A β diminuent la formation des dépôts et limitent les pertes cognitives, voire les annulent (Dodart et al., 2002; Morgan, 2006). Néanmoins, chez l'homme, l'application d'une telle stratégie n'a à ce jour pas montré de potentiel thérapeutique (Wisniewski and Boutajangout, 2010). L'hypothèse amyloïde, qui a été reconsidérée et étoffée à plusieurs reprises, continue d'être débattue.

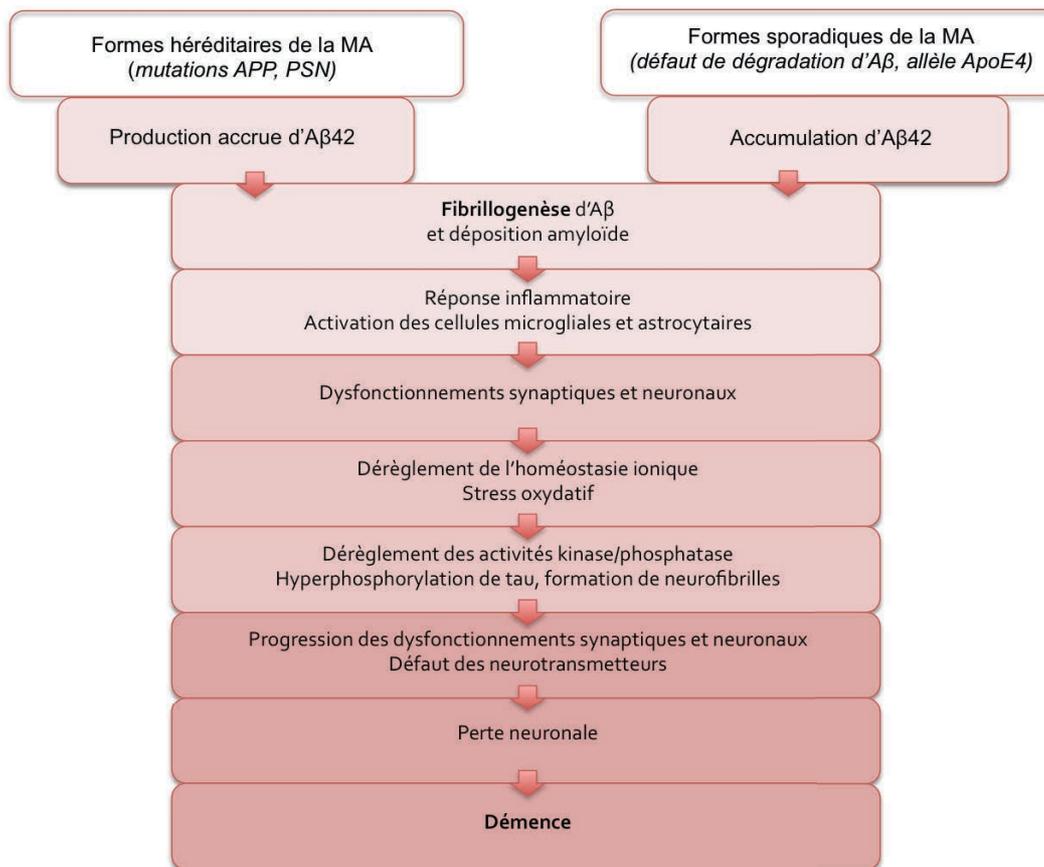


Figure 9. La cascade amyloïde.

L'hypothèse amyloïde stipule que la fibrillogenèse d'Aβ est l'événement initiateur de la MA, à l'origine d'une cascade de mécanismes pathogènes incluant une réaction inflammatoire, la formation des DNF, une dérégulation synaptique et une neurodégénérescence menant à la démence (d'après Hardy and Selkoe, 2002).

Les données en faveur de l'hypothèse amyloïde

L'hypothèse amyloïde fut proposée sur la base des données génétiques et reste à l'heure actuelle la plus cohérente de ce point de vue. Historiquement, le premier lien entre la surproduction d'Aβ et l'apparition de la MA fut établi à partir de la convergence entre la localisation du gène APP sur le chromosome 21 et le fait que les personnes atteintes du syndrome de Down développent précocement et invariablement une démence de type MA (Olson and Shaw, 1969; Glenner and Wong, 1984).

De nombreuses données vinrent abonder dans le sens de l'hypothèse amyloïde, montrant que le risque d'agrégation d'Aβ est augmenté aussi bien dans les formes génétiques que dans les formes sporadiques de la maladie :

- les personnes atteintes de trisomie 21 développent des plaques amyloïdes (Olson and Shaw, 1969; Glenner and Wong, 1984), à l'exception d'une patiente qui était porteuse de seulement 2 copies du gène APP (Prasher et al., 1998),
- les mutations liées aux formes génétiques de la MA entraînent l'élévation du taux d'A β , et plus généralement d'A β 42 (Borchelt et al., 1996; Duff et al., 1996; Citron et al., 1997; Di Fede et al., 2009; Ridge et al., 2013),
- la seule mutation protectrice connue mène au contraire à une diminution du niveau d'A β (Jonsson et al., 2012),
- ApoE4 favorise la fibrillogénèse d'A β (Strittmatter et al., 1993; Wisniewski et al., 1994),
- un défaut de dégradation d'A β par les Néprilysines est aussi associé aux formes sporadiques de la maladie (Iwata et al., 2001) ,
- le niveau de la β -sécrétase dans le liquide céphalo-rachidien est plus élevé chez des patients atteints de la MA que dans la population normale (Sennvik et al., 2000),
- dans les modèles transgéniques de la MA, l'apparition des dépôts amyloïdes est antérieure à celle des DNF (Oddo et al., 2003).

La remise en cause de l'hypothèse amyloïde

Certaines données cependant s'intègrent mal ou sont peu prises en compte par cette hypothèse amyloïde prédominante. Dans un premier temps, des études à grande échelle sur les populations âgées montrèrent que des individus n'ayant pas développé de démence peuvent néanmoins développer des dépôts amyloïdes (Braak and Braak, 1997; Duyckaerts and Hauw, 1997), que les DNF sont présents chez toutes les personnes âgées de plus de 80 ans (Braak and Braak, 1997), et que les deux types de lésions sont retrouvés de manière quasi-systématique chez les personnes centenaires (Hauw et al., 1986; Delaère et al., 1993). Ces données prouvèrent qu'il n'existe pas de lien systématique entre les lésions caractéristiques de la MA et la symptomatologie clinique. Il fut alors proposé que ces lésions fassent partie du vieillissement normal et soient responsables du déclin cognitif mais que, dans le cas pathologique de la MA, elles apparaissent précocement et accélèrent le déclin mnésique. Selon cette hypothèse, la MA serait une version accélérée du vieillissement cérébral normal.

Dans un second temps, plusieurs données vinrent remettre en cause le lien causal entre A β , DNF, perte neuronale et démence :

- la corrélation entre déposition amyloïde et perte neuronale n'est pas systématique (Cochran et al., 1991; Irizarry et al., 1997; Giannakopoulos et al., 2003),
- la perte neuronale est bien mieux corrélée à la déposition des DNF (Crespo-Biel et al., 2012), ce qui suggère que tau pourrait être le responsable de la neurodégénérescence, indépendamment d'A β ,
- le degré de déficience cognitive d'un patient ne correspond pas au nombre de dépôts amyloïdes présents dans son cerveau (Arriagada et al., 1992; Price et al., 2009),
- et chez les modèles murins de la MA, les déficits comportementaux apparaissent avant les plaques amyloïdes (Mucke et al., 2000; Oddo et al., 2003; Billings et al., 2005). Le dysfonctionnement cognitif pourrait donc être indépendant de la déposition amyloïde. Il n'existe toujours pas de données claires à l'heure actuelle sur le lien causal entre surproduction et/ou agrégation d'A β et perte mnésique.

Les hypothèses alternatives

Historiquement, l'hypothèse cholinergique (Perry, 1980) et l'hypothèse calcique de la MA (Khachaturian, 1994) ont été formulées avant l'hypothèse amyloïde, mais ont été quelque peu délaissées lors de l'identification des peptides A β . L'hypothèse cholinergique provient de l'observation que les patients atteints de la MA présentent un bas niveau d'acétylcholine transférase (ChAT) et fut corroborée par les modèles animaux présentant une perte spécifique de neurones cholinergiques, des déficits cognitifs, et une dérégulation de la maturation d'APP (Coyle et al., 1983). L'hypothèse calcique, quant à elle, se voulait être une hypothèse plus globale quant au vieillissement cérébral et la démence sénile statuant qu'un léger changement de l'homéostasie calcique se prolongeant sur une longue période de temps équivaut aux dommages causés par un changement brutal du niveau de calcium sur le fonctionnement neuronal. Des données continuent d'abonder dans le sens de cette hypothèse pour la MA mais cette hypothèse reste trop peu spécifique pour décrire les voies moléculaires menant aux pertes mnésiques. L'hypothèse tau n'est pas prédominante dans les explications sur l'origine de la MA car, bien que les DNF soient mieux corrélés à la neurodégénérescence, aucune mutation du gène tau n'est associée aux formes génétiques de la maladie. D'autres voies de recherche, comme par exemple l'hypothèse de la resurgance du cycle cellulaire (Vincent et al., 1996), ou encore l'exposition à l'aluminium, des neurotoxines ou une dérégulation des neurotransmetteurs excitateurs endogènes (McLachlan, 1986) ont été ouvertes mais restent non satisfaisantes.

Après la découverte de plaques séniles chez des sujets sains (Villemagne et al., 2008), et la décorrélation entre déposition amyloïde et altération cognitive, l'hypothèse amyloïde a évolué vers une nouvelle l'hypothèse amyloïde qui postule que ce n'est pas la fibrillogénèse d'A β qui est à l'origine de la MA, mais que les peptides A β sont déjà toxiques sous leur forme oligomérique (Walsh and Selkoe, 2007). En accord avec cette hypothèse, le développement de technique de dosage d'A β a permis de mettre en évidence une bonne corrélation entre le degré de démence des patients et la concentration des espèces d'A β solubles (Arriagada et al., 1992; Bierer et al., 1995; Giannakopoulos et al., 2003; Hyman et al., 1993). De plus, des études *in vitro* montrèrent que les oligomères A β sont plus neurotoxiques que les formes solubles ou fibrillaires (Karran et al., 2011). Cette hypothèse sous-tend que les plaques amyloïdes ne seraient pas la cause du dysfonctionnement mnésique dans la MA, même si le peptide amyloïde reste en haut de la cascade des événements pathologiques menant à la MA.

Les autres hypothèses telles que celle de l'inflammation (McGeer and McGeer, 1995), qui interroge la part de la réponse immune observée dans la MA dans le développement de la pathologie, la maladie à prions (Prusiner, 1984) et l'autophagie (Nixon, 2007), continuent de placer le peptide A β au centre de la MA, et en haut de la cascade pathologique provoquant la MA. Néanmoins la démonstration d'un lien causal direct entre un taux élevé d'A β et la perte mnésique n'est toujours pas établie. L'hypothèse synaptique (Terry, 1979; Masliah et al., 1991) et métabolique de la démence, qui attribue la MA, pour la première à la perte synaptique et neuronale, et pour la seconde à une dérégulation de la microvascularisation cérébrale, du métabolisme oxydatif et du glucose, et en particulier à un dysfonctionnement de la fonction mitochondriale de la production d'énergie, attribuent au peptide amyloïde un effet toxique mais interrogent aussi le rôle de leur précurseur APP ou de certains de ses fragments protéolytiques. Le rôle d'APP dans le développement de la MA reste relativement peu discuté en partie car, comme nous l'avons vu plus haut, les études en perte de fonction sont difficiles à mettre en place chez la souris. Pourtant, même dans les hypothèses qui placent le peptide amyloïde au centre de la MA, une contribution des autres métabolites issus de la protéolyse d'APP n'est peut-être pas à exclure. En effet, il semble important de considérer que la surproduction d'A β peut se faire aux dépens 1) de son précurseur membranaire et/ou 2) des métabolites issus de la voie non-amyloïdogénique, en autres du fragment sAPP α connu pour être neuroprotecteur et bénéfique pour la mémoire.

La drosophile se place comme une alternative intéressante pour l'étude des rôles physiologiques de la voie APP. En effet, les outils génétiques disponibles chez cet organisme permettent d'étudier la perte de fonction d'APPL, d'analyser spécifiquement chez l'adulte la toxicité de la voie amyloïdogénique, et de combiner les études de perte de fonction et de gain de toxicité afin d'évaluer leurs effets délétères relatifs sur la mémoire.

Chapitre 2. Le modèle drosophile

La drosophile a été introduite comme modèle animal au début du 20^{ème} siècle. L'étude de mutants a permis à Thomas Morgan et Hermann Müller d'établir les premières cartes génétiques et de proposer la théorie chromosomique de l'hérédité. Sa petite taille, sa facilité d'élevage, son cycle de reproduction court (10 j à 25°C) et la puissance des outils génétiques disponibles en font un modèle d'étude privilégié en biologie. Pour la neurobiologie, la drosophile a été largement employée car son système nerveux central, malgré sa taille très réduite (100.000 neurones contre un milliard chez l'Homme), est hautement structuré et fonctionne selon des mécanismes moléculaires identiques à ceux que l'on retrouve chez les organismes supérieurs et chez l'homme.

Un modèle pour l'étude de maladies humaines

Le génome de la drosophile contient 4 paires de chromosomes. Son séquençage achevé en l'an 2000 a permis d'estimer la présence d'environ 14.000 gènes codant des protéines (Adams et al., 2000) contre environ 22.500 chez l'homme. Un avantage majeur de la drosophile, comparée aux modèles mammifères, est le fait qu'il existe peu de redondance génétique, ce qui facilite les études de perte de fonction.

D'un intérêt particulier, plus de 70 % des gènes humains associés à une pathologie chez l'homme possèdent un orthologue dans le génome de la drosophile (Bernards and Hariharan, 2001; Reiter et al., 2001; Bier, 2005). Ceci suggère que les processus engagés dans ces pathologies présente un très fort degré de conservation des invertébrés aux mammifères. La drosophile a été utilisée pour étudier le rôle physiologique de ces gènes et également pour générer des modèles de ces maladies (Table 2).

De nombreuses maladies neurodégénératives incluant la MA, les tauopathies, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, ou encore l'ataxie de Friedreich ont été étudiées chez la drosophile (Bilen and Bonini, 2005; Puccio, 2009; Hirth, 2010; Iijima-Ando and Iijima, 2010; Sarantseva and Schwarzman, 2011; Whitworth, 2011). Dans le cas des maladies liées au vieillissement, la drosophile présente l'avantage d'avoir une durée de vie d'environ 60 jours, ce qui permet d'analyser un processus pathologique depuis son développement chez le jeune adulte jusqu'à son évolution au cours du vieillissement.

Disease	Human gene symbol	Fly gene symbol	Gene product
Dysmorphology			
Synpolydactyly	<i>HOXD13</i> ^h	<i>Abd-B</i> ^h	Transcription factor
Single bone in zeugopod	<i>HOXD3-HOXD13</i> (heterozygous deletion)	<i>Abd-B</i> ^h	Transcription factor
Hand-foot-genital syndrome	<i>HOXA13</i> or heterozygous <i>HOXA11-13</i> deletion	<i>Abd-B</i> ^h	Transcription factor
Aniridia	<i>PAX6</i>	<i>ey</i> ^h , <i>toy</i> ^h	Transcription factor
Townes-Brocks syndrome	<i>SALL1</i>	<i>salm</i> ^h , <i>salr</i> ^h	Transcription factor
Saethre-Chotzen syndrome	<i>TMST1</i>	<i>twi</i> ^h	Transcription factor
Pfeiffer syndrome	<i>FGFR1</i> , <i>FGFR2</i>	<i>htl</i> ^h	RTK
Apert syndrome	<i>FGFR2</i>	<i>htl</i> ^h	RTK
Crouzon syndrome	<i>FGFR3</i>	<i>htl</i> ^h	RTK
Saethre-Chotzen syndrome-like	<i>FGFR3</i> , gain-of-function?	<i>htl</i> ^h	RTK
Alagille syndrome	<i>JAG1</i>	<i>Ser</i> ^h , <i>Dl</i> ^h	Notch ligand
Spondylocostal dysostosis	<i>DLL3</i>	<i>Dl</i> ^h	Notch ligand
Primary congenital glaucoma	<i>CYP1B1</i>	<i>Cyp18a1</i> ^h	Cytochrome P450
Cardiac disease			
Congenital heart disease	<i>NKX2-5</i> <i>GATA4</i>	<i>tin</i> ^h <i>pnr</i> ^h	Transcription factor Transcription factor
Holt-Oram syndrome	<i>TBX5</i>	<i>Doc1-Doc3</i> ^h	Transcription factor
DiGeorge syndrome	<i>TBX1</i>	<i>org-1</i> ^h , <i>bi</i> ^h	Transcription factor
Venous malformations	<i>TEK</i>	<i>htl</i> ^h	RTK
Neurological			
Spinocerebellar ataxia	<i>SCA1</i> (also known as <i>ATXN1</i>) <i>SCA2</i> (also known as <i>ATXN2</i>) <i>SCA6</i> (also known as <i>CACNA1A</i>) <i>SCA14</i> (also known as <i>PRKCG</i>) <i>SCA17</i> (also known as <i>TBP</i>)	<i>CG4547</i> <i>CG5166</i> <i>cac</i> ^h , <i>Ca-α1D</i> ^h <i>inaC</i> ^h , <i>Pkc53E</i> <i>Tbp</i> ^h	Transcription cofactor? Unknown Ca ²⁺ ion channel Ca ²⁺ -dependent PKC TATA binding protein
Huntington disease	<i>HD</i>	<i>huntingtin</i> ^h	Axonal transport?
Spinal and bulbar muscular atrophy 3	<i>AR</i>	<i>ERR</i> , <i>svp</i> ^h	Androgen receptor
Parkinson disease	<i>PARK2</i> <i>PARK5</i> (also known as <i>UCHL1</i>) <i>PARK7</i> <i>NR4A2</i> <i>MAPT</i> <i>PINK1</i> <i>SNCA</i>	<i>park</i> ^h <i>Uch</i> <i>df-β</i> , <i>CG6646</i> <i>Hr38</i> ^h <i>tau</i> ^h <i>CG4523</i> ^h None known	E3-ubiquitin ligase Ubiquitin pathway Androgen-R regulator? Nuclear hormone receptor Microtubule binding PTEN-induced kinase Dopamine transmission?
Alzheimer disease	<i>PSEN1</i> , <i>PSEN2</i> <i>APP</i>	<i>Psn</i> ^h <i>App</i> ^h	γ-Secretase Signalling, axonal transport?
Fragile X syndrome	<i>FMR1</i>	<i>Fmr1</i> ^h	Translational regulator
Angelman syndrome	<i>UBE3A</i>	<i>dube3A</i> ^h	E3-ubiquitin ligase
Cancer			
Tuberous sclerosis	<i>TSC1</i> , <i>TSC2</i>	<i>tsc1</i> ^h , <i>tsc2</i> ^h	GAP for RHEB in TOR pathway
Endometrial carcinoma	<i>PTEN</i>	<i>Pten</i> ^h	Negative regulator PI3K
No known disease mutations in homologue	<i>LATS1</i>	<i>wts</i> ^h (also known as <i>lats</i>)	Cyclin regulation?
Renal cancer lines	<i>SAV1</i>	<i>sav</i> ^h	Cyclin regulation?
No known disease mutations in homologue	<i>MST1</i> , <i>MST2</i> (also known as <i>STK3</i>)	<i>hpo</i> ^h	Cyclin regulation?
Bladder and colorectal cancer	RAS family genes	<i>Ras85D</i> ^h	RTK signalling
No known disease mutations in homologues	<i>SCRIB</i> , <i>LLGL1</i> , <i>DLG1</i>	<i>scrib</i> ^h , <i>l(2)g^h</i> , <i>dlg1</i> ^h	Cell polarity, metastasis in the presence of RAS-V12
B-cell leukaemia	<i>CCND1</i>	<i>CycD</i> ^h	Cell cycle
Melanoma	<i>CDK4</i>	<i>Cdk4</i> ^h	Cell cycle
Retinoblastoma	<i>RB1</i>	<i>Rbf</i> ^h , <i>Rbf2</i>	Cell cycle
Hepatocellular carcinoma	<i>TP53</i>	<i>hth</i> ^h (e<10 ⁻¹⁰)	Cell cycle
Ectodermal dysplasia	<i>TP73L</i>	<i>hth</i> ^h (e<10 ⁻⁷)	Cell cycle

Table 2. Liste des maladies humaines pour lesquelles la Drosophile est un modèle d'étude.

La Drosophile possède un orthologue pour plus de 70% des gènes impliqués dans des maladies humaines. (Bier, 2005)

Des outils génétiques

Les premiers mutants de mémoire olfactive *dunce* et *amnesiac* ont été identifiés par mutagenèse aléatoire au méthane sulfonate d'éthyle (Dudai et al., 1976; Quinn et al., 1979). Depuis, de nombreux outils génétiques ont été développés pour contrôler l'expression de transgènes d'intérêt de façon spatio-temporelle, et ils permettent aujourd'hui d'atteindre une résolution spatiale proche du neurone unique.

Les transposons

Les transposons sont des séquences mobilisables qui peuvent être naturellement insérées dans le génome grâce une enzyme codée par le transposon lui-même, la transposase (Engels et al., 1990). La transposase reconnaît une séquence d'une trentaine de nucléotides présente à chacune des extrémités du transposon. L'élément transposable P a été génétiquement modifié de telle sorte qu'il ne se puisse plus se déplacer de façon autonome : la séquence de la transposase a été remplacée par la séquence d'un transgène d'intérêt (gène sauvage ou muté, séquence ARNi, etc). Cet élément P muté peut être inséré dans le génome de manière aléatoire ou dirigée. Son insertion peut altérer le niveau d'expression ou le produit du gène dans lequel il est inséré. Afin d'éviter des effets insertionnels délétères, on peut utiliser des sites d'insertion identifiés pour leur innocuité sur la fonction étudiée, la mémoire par exemple.

Le système UAS/GAL4.

Le système binaire UAS^{Gal4}/GAL4 (pour Upstream Activating Sequence), système d'activation de transcription issu de la levure, est largement utilisé chez la drosophile pour contrôler artificiellement l'expression de transgènes d'intérêt de façon tissu-spécifique (Brand and Perrimon, 1993). D'une part, les séquences qui codent l'activateur de transcription GAL4 sont insérées grâce à un élément P dans la région promotrice d'un gène ayant un profil d'expression particulier. La lignée résultante est appelée « pilote d'expression ». D'autre part les séquences UAS^{Gal4} (UAS) placées en amont des séquences d'intérêt sont insérées grâce à un élément P dans une seconde lignée. Cette lignée porte de façon ubiquitaire le transgène d'intérêt qui ne peut s'exprimer en l'absence de la protéine GAL4. La descendance issue du croisement de ces deux lignées exprimera le transgène d'intérêt selon le patron d'expression de la protéine GAL4. En plus du contrôle spatial ainsi atteint, des modifications apportées à ce système ont permis d'ajouter une dimension temporelle.

Le système inductible GeneSwitch

L'activateur de transcription GAL4 a été fusionné au domaine d'activation de la protéine humaine p65 et à un site de fixation à la progestérone pour former la protéine Gal4-Switch (Osterwalder et al., 2001; Roman et al., 2001). La conformation de cette protéine ne lui permet pas de se fixer aux séquences UAS. La liaison du ligand, le RU486 (RU), agoniste du récepteur à la progestérone, modifie la conformation de la protéine Gal4-Switch et rend possible sa liaison aux séquences UAS. La transcription du transgène d'intérêt est alors activée (Figure 10). Le RU est ajouté dans le milieu de culture des drosophiles au moment désiré. Il est ingéré et métabolisé en quelques heures. Le système est réversible en l'absence du ligand.

Le système inductible thermosensible TARGET

L'activateur de transcription GAL4 est naturellement inhibé par la protéine GAL80 (Lee and Luo, 1999). La protéine GAL80^{ts} est un mutant thermosensible (McGuire et al., 2004). A basse température (température restrictive), GAL80^{ts} se lie normalement à GAL4 et l'empêche de se fixer aux séquences UAS ; la transcription dépendante de GAL4 est donc inhibée. A haute température (supérieure à 29°C, température permissive) la protéine GAL80^{ts} est inactive, ce qui permet à GAL4 de se fixer à ses séquences UAS et d'induire la transcription du transgène placé en aval. Ce système est également réversible.

Un modèle pour l'étude de la mémoire

La drosophile est capable de produire une variété de comportements complexes que l'on peut étudier en laboratoire. Par exemple, les rythmes circadiens, l'alimentation, le sommeil (Kolker and Turek, 1999; Amrein and Thorne, 2005; Harbison et al., 2009), la navigation spatiale pendant le vol (Greenspan and Dierick, 2004), le comportement de cour et l'agression (Griffith and Ejima, 2009; Dahanukar and Ray, 2011), ou encore l'apprentissage et la mémoire (McGuire et al., 2005). Ce dernier aspect du répertoire comportemental de la drosophile est d'un intérêt tout particulier pour la MA. La drosophile peut générer plusieurs types de mémoire complexes dont les caractéristiques sont similaires à celles décrites chez les autres espèces (Davis, 2005).

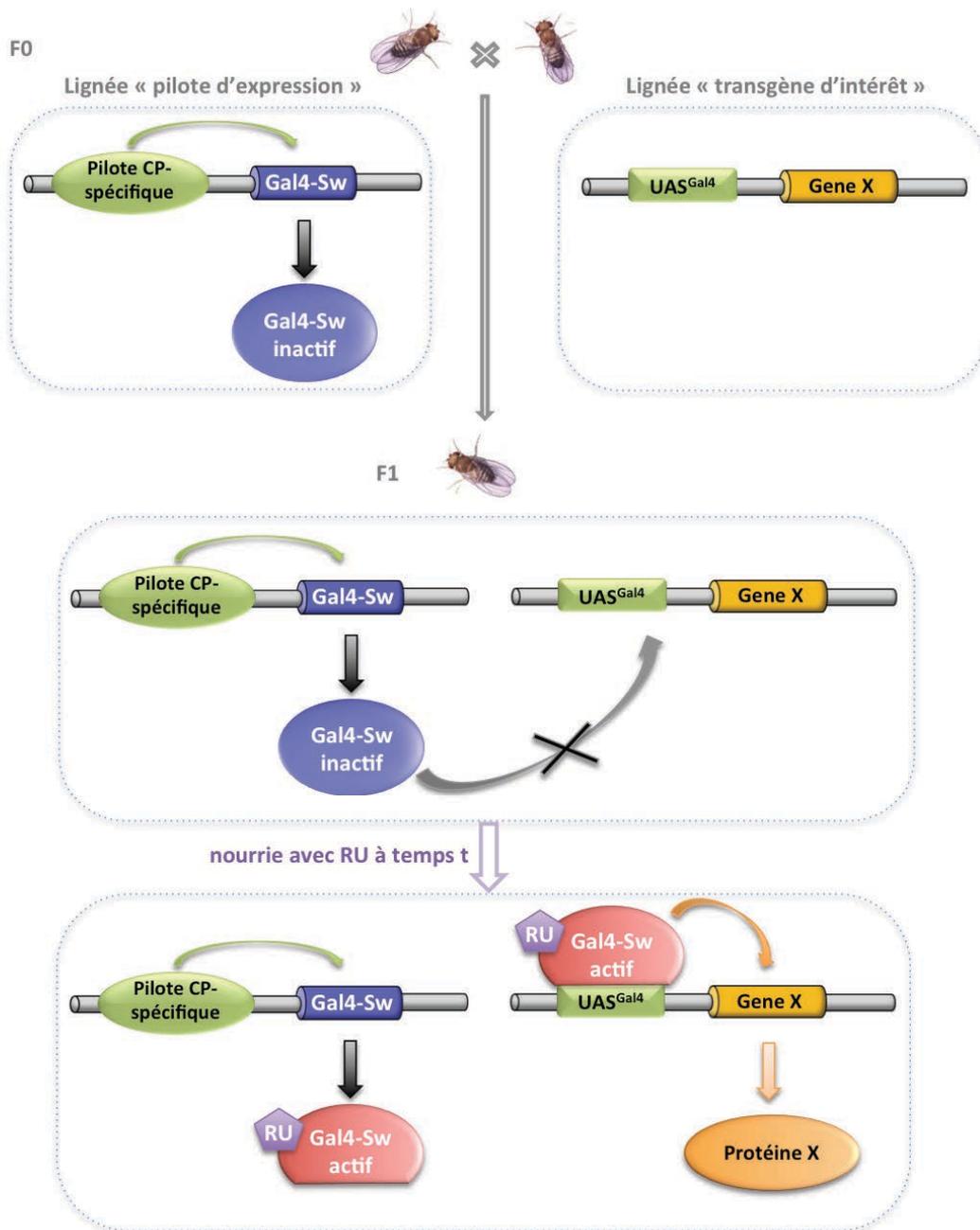


Figure 10. Le système inductible GeneSwitch.

L'ajout de RU dans le milieu nutritif des drosophiles permet de rendre la protéine de fusion Gal4-Switch active et d'induire l'expression d'un gène d'intérêt placé en aval de la séquence UAS. Le système est réversible. (Osterwalder et al., 2001). Dans l'exemple montré ici, l'expression de la protéine Gal4-Switch se fait spécifiquement dans les neurones qui composent les Corps Pédonculés (CP).

Anatomie du système nerveux central

Le système nerveux central de la drosophile est divisé en deux grandes parties : la chaîne nerveuse ventrale, comprenant les ganglions thoraciques et abdominaux reliés au système nerveux périphérique, et le cerveau. Le cerveau fonctionne selon les mêmes principes généraux que celui des mammifères (Ito et al., 1998; Shimada et al., 2005; Tanaka et al., 2008). En revanche son organisation est particulière : les corps cellulaires des neurones sont massés à la périphérie, tandis que les projections axonales et dendritiques se regroupent au centre pour former le neuropile.

Le cerveau de la drosophile est traversé par le tube digestif de manière antéropostérieur, divisant celui-ci en ganglions supra- et sub-oesophagiens. Le ganglion sub-oesophagien est impliqué dans le traitement des informations gustatives. Il reçoit l'information relayée par les neurones gustatifs présents au niveau des palpes labiaux, des pattes et des ailes qui envoient leurs dendrites jusqu'au bout des soies, permettant un contact direct avec les molécules présentes dans l'environnement. Le ganglion supra-oesophagien est plus volumineux et composé de trois neuromères :

- *Le protocerebrum* est composé de quatre structures : les lobes optiques, la *pars-intercerebralis*, le complexe central et les corps pédonculés (CPs). Les lobes optiques situés de part et d'autre du cerveau sont impliqués dans le traitement des informations visuelles. La *pars-intercerebralis* est considérée comme l'équivalent du système neuroendocrine central. Le complexe central inclut le pont protocérébral, le corps en éventail, deux nodules et le corps en ellipse. De par sa position, il reçoit un grand nombre d'afférences, essentiellement convoyant des informations locomotrices (Strauss and Heisenberg, 1993). Il a été également impliqué dans de nombreux processus mnésiques : olfactifs (Pascual et al., 2004; Wu et al., 2007), visuels (Pan et al., 2009) ou spatiaux (Neuser et al., 2008), ainsi que dans le comportement de cour (Sakai and Kitamoto, 2006). Les CPs constituent une structure bilatérale selon l'axe de symétrie du cerveau (Figure 11) et sont séparés du reste du neuropile par une couche de cellules gliales. Ils jouent un rôle important dans de nombreux processus physiologiques, tels que le sommeil (Bushey and Cirelli, 2011), le comportement de cour (McBride et al., 1999), et l'activité locomotrice (Martin et al., 1998), mais ils ont surtout été identifiés comme le centre de l'apprentissage et de la mémoire olfactive (Heisenberg et al., 1985). Les CPs sont le relai secondaire de l'information olfactive au niveau central. Nous décrirons leur anatomie plus en détail dans un paragraphe suivant.

- *Le deutocerebrum* est constitué principalement des lobes antennaires. Il constitue le relai primaire de l'information olfactive.

- *Le tritocerebrum* est composé de deux petits lobes bilatéraux reliés par un faisceau de fibres nerveuses appelé « commissure » dont la composition et la fonction restent mal décrites. Ils seraient impliqués dans le contrôle des interactions entre le proboscis et le tube digestif, via les nerfs stomatogastriques.

Le traitement de l'information olfactive

Les antennes constituent l'organe sensoriel olfactif, ils détectent les molécules odorantes de l'environnement au niveau de sensilles où sont localisés les dendrites des neurones olfactifs (Stocker, 1994). Les neurones olfactifs, projettent leurs axones vers le centre olfactif primaire : les lobes antennaires, où ils connectent les dendrites des neurones de projection cholinergiques (Stocker et al., 1997). Chaque synapse neurone olfactif / neurone de projection est entourée d'interneurones excitateurs (cholinergiques) ou inhibiteurs (GABAergiques), formant une structure sphérique appelée glomérule. Les neurones de projection, dont les corps cellulaires sont localisés en périphérie des lobes antennaires, envoient leurs axones aux centres olfactifs secondaires: la corne latérale et les CPs (Jefferis et al., 2001; Lin et al., 2007).

On dénombre une cinquantaine de glomérules pour 1.300 neurones olfactifs. Les connexions synaptiques s'organisent selon une carte olfactive stéréotypée : chaque neurone olfactif n'exprime qu'un seul des 61 types de récepteur olfactif décrits (Vosshall et al., 1999, 2000; Larsson et al., 2004), et les neurones olfactifs exprimant le même récepteur projettent sur le même glomérule (Gao et al., 2000). Les neurones de projection issus d'un même glomérule présentent des projections similaires au niveau de la corne latérale tandis qu'au niveau des CPs, il a été montré qu'une même molécule odorante a un profil d'activation différent d'un individu à l'autre (Jefferis et al., 2001; Marin et al., 2002; Murthy et al., 2008). Ainsi il existe une ségrégation spatiale au niveau des deux relais secondaires olfactifs mais elle est de nature différente (Wang et al., 2001) : la stéréotypie de la carte olfactive au niveau de la corne latérale est en accord avec sa fonction supposée de reconnaissance des odeurs, tandis que la représentation plastique au niveau des CPs correspondrait aux mécanismes de discrimination et d'encodage des odeurs pendant l'apprentissage olfactif.

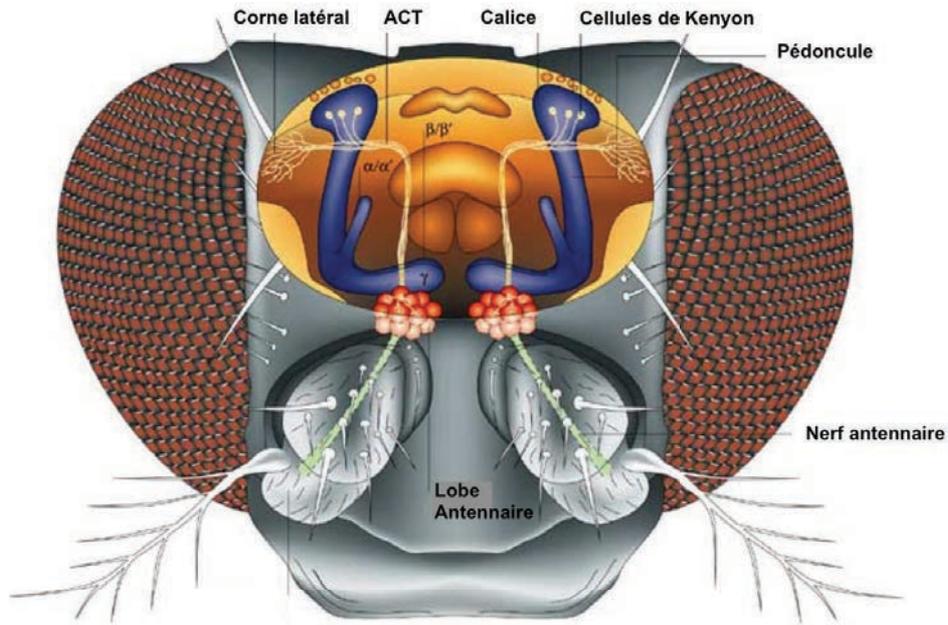


Figure 11. Représentation schématique du cerveau de la drosophile.

Les Corps Pédonculés (CPs) constituent le centre de l'apprentissage et de la mémoire olfactive, ils sont ici représentés au centre en bleu. ACT, tractus anténaire cérébral. (Heisenberg, 2003)

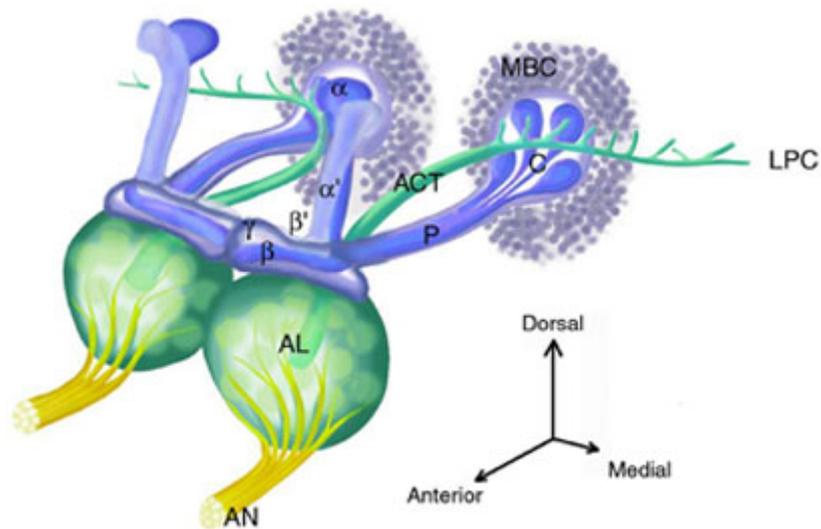


Figure 12. Représentation schématique du système olfactif de la drosophile.

L'information olfactive est transmise des neurones sensoriels aux lobes anténaires (AL) via le nerf anténaire (AN). L'information est ensuite relayée par les neurones de projection via le tractus anténaire cérébral (ACT) aux CPs (représentés en bleu), et à la corne latérale (LPC) en position dorsale. Les neurones de projection connectent les dendrites des cellules de Kenyon des CPs (MBC) au niveau des calices (C). Les cellules de Kenyon projettent leurs axones via le pédoncule (P) où ils se séparent pour former les lobes fonctionnels des CPs : trois lobes médians (β , β' et γ) et deux lobes verticaux (α et α') par hémisphère (from R.Davis lab).

Les Corps Pédonculés, centre de la mémoire olfactive

Chaque CP est composé d'environ 2.000 neurones dits intrinsèques, appelés cellules de Kenyon, et de neurones dits extrinsèques, afférents ou efférents (Ito et al., 1998). Les corps cellulaires des cellules de Kenyon, situés dans la partie dorsale postérieure de chaque hémisphère, projettent leurs dendrites dans les calices, structures volumineuses et arrondies situées en dessous des corps cellulaires. Ces dendrites reçoivent des afférences olfactives provenant des lobes antennaires par le tractus antenno-glomérulaire, et peut-être des afférences d'autres modalités sensorielles (Stocker et al., 1990).

Les axones des cellules de Kenyon projettent de manière fasciculée pour former le pédoncule qui se termine au niveau dorsal des lobes antennaires. A cet endroit, les axones se divisent pour former différents lobes: trois lobes médians (β , β' et γ), et deux lobes verticaux (α et α') (Crittenden et al., 1998). Il existe 3 types de cellules de Kenyon α/β , α'/β' et γ . Les axones des premières se séparent pour former les lobes α et β , les axones des secondes bifurquent pour former lobes α' et β' , et enfin, les axones des troisièmes forment le lobe horizontal γ (Figure 12). Les lobes reçoivent des informations de nombreux neurones afférents provenant du neuropile, pouvant répondre à plusieurs modalités sensorielles (Ito et al., 1998). Les neurones efférents des CPs ne renverraient pas les informations directement vers les zones motrices, mais pourraient les connecter soit *via* plusieurs interneurons soit *via* les autres centres de traitement du *protocerebrum* antérieur (Ito et al., 1998).

La nature des neurotransmetteurs utilisés par les cellules de Kenyon reste débattue (aucun des neurotransmetteurs classiques ne semble être utilisé par les CPs) et fait toujours l'objet d'études. A l'heure actuelle, des analyses approfondies suggèrent une subdivision de ces trois classes de cellules de Kenyon et décrivent une hyperspécialisation de chacune.

Le conditionnement olfactif aversif et le test de mémoire

Nous utilisons au laboratoire un paradigme de conditionnement associatif aversif opérant. Un paradigme opérant est un test comportemental qui repose sur l'observation d'une action de l'animal. Un conditionnement associatif repose sur le principe d'induire une association artificielle entre deux stimuli. L'un de ces stimuli est neutre, l'autre évoque une réponse comportementale innée. Durant le conditionnement, les deux stimuli sont présentés simultanément (dans notre cas une odeur et des chocs électriques). Durant le test mnésique, seul le stimulus neutre est présenté (ici, l'odeur). S'il induit la réaction comportementale

artificiellement associée (l'évitement aux chocs), alors on estime que l'animal a appris et l'on mesure la rétention de cette mémoire (Figure 13).

Le conditionnement olfactif chez la drosophile est apparu dans les années 1970. La mise au point d'une machine à test (Tully and Quinn, 1985), puis celle d'un barillet de conditionnement (Pascual and Prémat, 2001) ont permis l'amélioration et l'automatisation des études de mémoire. L'équipement dont nous disposons nous offre des capacités d'expérimentation considérables. Chaque expérience repose sur l'analyse de plusieurs milliers d'individus testés en groupes d'une trentaine de drosophiles.

Un barillet de conditionnement permet d'exposer 6 groupes de mouches indépendants à un flux d'air chargé ou non de molécules odorantes, associé ou non à la délivrance de légers chocs électriques. Lors d'un cycle de conditionnement, une première odeur est présentée couplée à l'envoi de chocs électriques, puis une seconde odeur est présentée, seule. Afin de palier à une préférence éventuelle ou une meilleure perception vis-à-vis de l'une des odeurs, deux conditionnements inverses sont successivement réalisés.

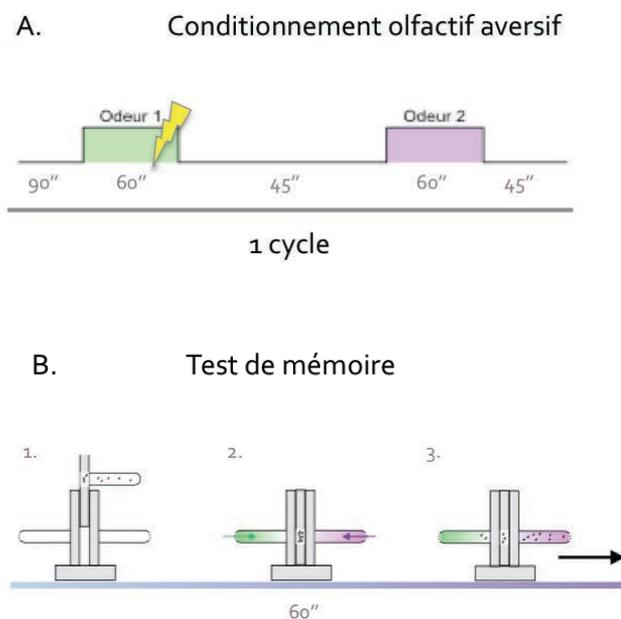


Figure 13. Principe du conditionnement olfactif aversif et du test de mémoire.

A. Durant le conditionnement olfactif, les mouches sont successivement mises en présence de deux odeurs. La présentation de la première odeur est associée à celle de légers chocs électriques.

B. Durant le test de mémoire, les mouches peuvent choisir pendant 1 min entre deux compartiments où sont à nouveau présentées les deux odeurs mais sans chocs électriques. Les mouches qui ont retenu l'association évitent la première odeur.

Le test de mémoire s'effectue dans un appareil qui permet de placer les mouches au centre de deux compartiments similaires chacun rempli de l'une des deux odeurs. La proportion de mouches évitant le compartiment contenant l'odeur qui a été associée aux chocs électriques reflète la proportion d'individus ayant retenu l'association apprise. Un score de mémoire est composé de la moyenne des deux expériences inverses.

Différents protocoles induisent différents types de mémoire

Le conditionnement que nous venons de décrire permet en cinq minutes seulement d'induire la formation d'une mémoire aversive qui dure plusieurs heures. Si le test de mémoire est réalisé immédiatement après le conditionnement, il reflète la mémoire immédiate ou apprentissage. Si le test est réalisé après quelques heures, la mémoire mesurée, appelée mémoire à court terme (STM), est constituée de deux composantes : une partie labile et une partie plus résistante. L'on peut les distinguer en appliquant 1 h avant le test un choc thermique par le froid. La partie labile de la mémoire ne résiste pas à ce stress et est effacée. La mémoire qui persiste est qualifiée de mémoire résistante à l'anesthésie (ARM). La mémoire labile décline plus rapidement dans le temps que la ARM (Folkers et al., 1993).

Si le test mnésique est effectué 24 h après un cycle de conditionnement, la partie labile de la mémoire est absente, et seule la ARM subsiste. Il est possible de modifier le rapport mémoire labile/ARM en effectuant cinq cycles successifs de conditionnement. Ce protocole, appelé conditionnement massé, privilégie la formation de la ARM (Tully et al., 1994). Il est possible d'induire la formation d'un autre type de mémoire consolidée en effectuant cinq cycles de conditionnement séparés chacun par un intervalle de repos de 15 min. Ce protocole est appelé conditionnement espacé. La mémoire ainsi induite dure jusqu'à une semaine, elle est appelée mémoire à long-terme (LTM). La LTM est classiquement mesurée 24 h après un conditionnement espacé. Tout comme la ARM, cette mémoire consolidée est résistante à l'anesthésie par le froid, mais au contraire de la ARM, sa formation est dépendante d'une synthèse protéique *de novo* (Tully et al., 1994; Yin et al., 1994).

Dynamique des mémoires aversives et mécanismes moléculaires sous-jacents

Le modèle classique admis aujourd'hui stipule que la formation des mémoires aversives se fait selon deux voies parallèles (Figure 14). Suite à un cycle de conditionnement, deux types d'apprentissage seraient simultanément initiés, différant très probablement non pas d'un point de vue moléculaire mais par la localisation au sein des CPs dans lesquels ils ont lieu. Du premier type d'apprentissage découlerait la formation de la mémoire labile qui pourrait être

consolidée en LTM par un conditionnement espacé. Parallèlement, le second type d'apprentissage formerait la ARM qui pourrait être consolidée par un conditionnement massé. Les mécanismes de consolidation mis en jeu dans la LTM et la ARM seraient antagonistes (Isabel et al., 2004).

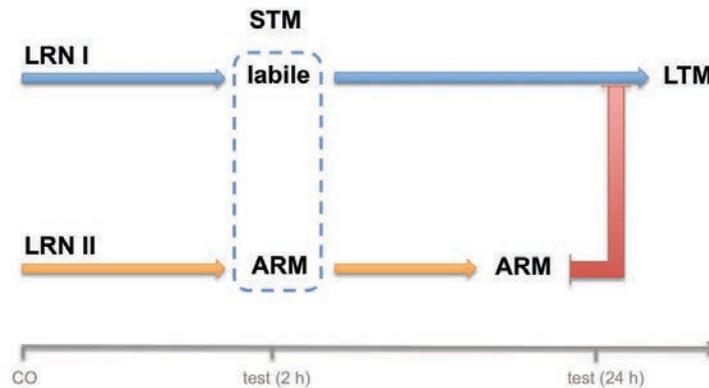


Figure 14. Les deux voies parallèles de formation des mémoires aversives.

Selon ce modèle, deux voies d'apprentissage (LRN) sont initiées lors d'un conditionnement olfactif (CO), induisant parallèlement la formation d'une mémoire labile, qui peut être consolidée par un conditionnement espacé pour former de la LTM ; et de la ARM, qui peut être consolidée par un conditionnement massé. Les protocoles de conditionnement n'apparaissent pas sur ce schéma. ARM et LTM ne peuvent coexister. La STM, testée à 2 h, est composée d'une partie labile et de ARM (d'après Isabel et al., 2004).

La découverte de mutants spécifiques de chacune de ces mémoires a permis d'identifier les acteurs moléculaires spécifiquement mis en jeu. Le mutant *rutabaga* (*rut*) est l'un des premiers mutants d'apprentissage décrits (Duerr and Quinn, 1982). Le gène *rut* code une adénylate cyclase, enzyme dont l'activation provoque l'augmentation de la concentration intracellulaire d'AMPc. La dépolarisation des neurones de projection qui transmettent l'information olfactive, induit des vagues calciques dans les CPs. La fixation de monoamines, qui indiquent la perception des chocs, active les récepteurs couplés aux protéines G (GPCR). Lorsque l'augmentation du calcium intracellulaire est concomitante de l'activation des GPCR, l'adénylate cyclase *rut* dépendante de la voie Ca^{2+} /calmoduline est activée (Livingstone et al., 1984; Levin et al., 1992). Le laboratoire a proposé que *rut* serve ainsi de détecteur de coïncidence entre l'odeur et les chocs électriques au niveau des CPs (Gervasi et al., 2010), et que ce mécanisme représente le mécanisme moléculaire de l'apprentissage. Le mutant *rut* ne présente pas de défaut de ARM, c'est pourquoi il a initialement été proposé qu'il existerait deux voies parallèles d'apprentissage. *Rut* serait responsable de l'apprentissage spécifique de

la voie labile-LTM, et ce, au niveau des lobes α et β . Des travaux en cours au laboratoire tendent à démontrer l'existence d'une autre adénylate-cyclase responsable de la seconde voie d'apprentissage au niveau des lobes α' et β' . De nombreux composants de la voie de l'AMPC ont été impliqués dans les premières étapes de la mise en place de la mémoire. Leur fonction reste moins comprise :

- la phosphodiesterase *dunce* (Dudai et al., 1976) régule la concentration intracellulaire d'AMPC (Byers et al., 1981). Elle est particulièrement exprimée dans les CPs (Nighorn et al., 1991),
- le peptide *amnesiac* (Quinn et al., 1979) est l'homologue du neuropeptide PACAP présent chez les mammifères qui est connu pour activer les adénylate cyclases (Miyata et al., 1989),
- la Protéine Kinase A (PKA) (Skoulakis et al., 1993; Li et al., 1996) est activée suite à l'augmentation d'AMPC (Drain et al., 1991). Elle est préférentiellement exprimée dans les CPs (Crittenden et al., 1998),
- les protéines G (Connolly et al., 1996) activent les adénylate cyclases,
- la protéine Go (Guillén et al., 1990; Ferris et al., 2006) est activée par les GPCR et inhibe les canaux Ca^{2+} voltage-dépendant. Elle inhibe également les adénylate cyclases.

Divers cribles ont permis de mettre à jour l'existence de nombreux gènes spécifiquement impliqués dans la formation de la LTM. Nous n'en ferons pas ici la liste exhaustive, mais leur analyse reflète la multiplicité des acteurs moléculaires intervenant dans la mise en place de la LTM. Ont été impliquées :

- la synthèse protéique *de novo*, et sa régulation via la voie de la kinase calmoduline-dépendante CamKII (Malik et al., 2013),
- la traduction locale des ARNm, aussi bien dans les terminaisons post-synaptiques au niveau des calices, que dans les terminaisons pré-synaptiques au niveau des lobes (Dubnau et al., 2003),
- la régulation de la transcription de gènes spécifiques via des facteurs de transcription de la famille CREB (cAMP-Response Element Binding) qui sont activés par phosphorylation par la PKA en réponse à une augmentation du taux d'AMPC (Yin et al., 1995),
- la régulation de la localisation subcellulaire de l'activité PKA via l'AKAP Yu, une protéine d'ancrage à la PKA qui est exprimée préférentiellement dans les CPs (Lu et al., 2007),

- la régulation de la stabilité des protéines via Crammer, un inhibiteur des protéases à cystéine (Comas et al., 2004), Debra, un médiateur de la dégradation protéique dépendante du lysosome (Kottler et al., 2011), ou encore la neurotrypsine Tequila (Didelot et al., 2006),
- la voie de signalisation Notch qui est impliquée dans le contrôle de la différenciation cellulaire durant le développement. Chez l'adulte, l'inhibition de Notch induit un défaut de LTM (Ge et al., 2004; Presente et al., 2004).

De façon intéressante, l'on remarquera que la plupart des composés impliqués dans l'apprentissage ont été cités comme modulateur de la protéolyse d'APP, et que la capacité de la partie intracellulaire d'APP à réguler la transcription de gènes est compatible avec un rôle dans les mécanismes mis en jeu pour l'établissement de la mémoire à long-terme.

Les mécanismes moléculaires responsables de la mise en place et de la consolidation de la ARM ne sont pas identifiés. Le premier mutant caractérisé comme étant spécifique de la ARM est le mutant *radish* (*rsh*) (Folkers et al., 1993). Ses capacités d'apprentissage sont normales mais sa mémoire décline rapidement. Rsh est une protéine préférentiellement exprimée dans les CPs. Elle possède un site de liaison à la protéine Rac1 et 23 sites de phosphorylation par protéines kinases A et C, ce qui suggère un lien avec la voie de signalisation dépendante de l'AMPc. La diminution de l'activité de la PKA dans les CPs entraîne une diminution de la partie labile de la STM, mais aussi une augmentation de la ARM (Skoulakis 1993 ; Horiuchi et al., 2008). L'activité de la PKA pourrait donc moduler la formation d'un type de mémoire par rapport à un autre.

ARM et LTM ne peuvent coexister, ce qui a permis de suggérer un antagonisme entre les mécanismes de consolidation mis en jeu dans chacune des deux voies. Les mutants anatomiques *ala* (alpha-lobes absent) dépourvus de lobes verticaux forment de la ARM, mais pas de LTM (Pascual and Préat, 2001), ce qui suggérait dans un premier temps que ces deux types de mémoire sont indépendants. Le laboratoire a récemment mis en évidence un mécanisme qui pourrait servir d'antagonisme entre ARM et LTM. Un conditionnement olfactif induit des oscillations calciques dans deux paires de neurones dopaminergiques afférents aux CPs, MP1 et MV1. Ces oscillations augmentent quantitativement et qualitativement lors des 15 min qui séparent chaque cycle du conditionnement espacé, et elles conditionnent la mise en place de la LTM (Plaçais et al., 2012).

La Protéine Précurseur Amyloïde-*like*, l'orthologue d'APP

Conservation fonctionnelle entre APP et APPL

La protéine APPL a été identifiée en 1989 d'après son homologie de séquence avec la protéine APP humaine (Rosen et al., 1989). APPL présente 25.5 % d'identités et 39.5 % de similarités avec l'isoforme APP₆₉₅ (Figure 16).

Le gène non essentiel *Appl* est situé à l'extrémité du chromosome X entre les loci *elav* (*embryonic lethal abnormal visual system*) et *vnd* (*ventral nervous system condensation defective*) (Luo et al., 1992). A l'aide d'événements de recombinaison entre chromosomes synthétiques, Luo et al. (1992) ont généré une lignée déficiente pour le gène *Appl* notée *Appl^d* (Figure 15). Les mouches *Appl^d* ne montrent pas de défauts anatomiques majeurs. De subtils changements au niveau de l'anatomie cérébrale ainsi qu'un défaut de phototaxie ont été rapportés. Les déficits comportementaux sont compensés par l'expression d'APP humaine (Luo et al., 1992), montrant qu'il existe, en plus d'une conservation de séquence et de structure, une conservation fonctionnelle entre les protéines humaine et de drosophile.

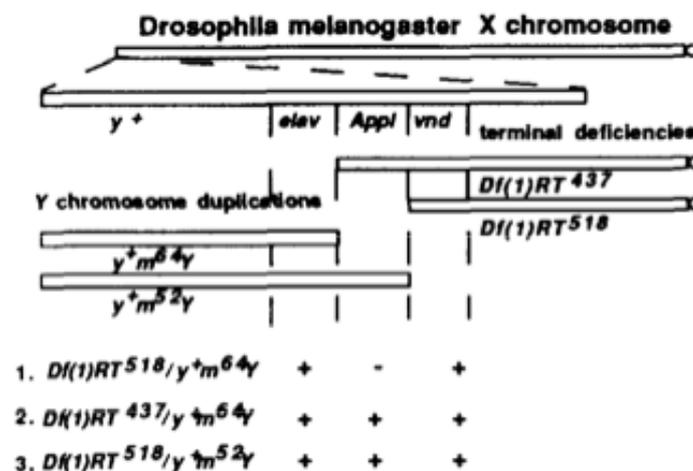


Figure 15. Stratégie employée pour la construction de la lignée déficiente *Appl^d*.

Le gène *Appl* est situé à l'extrémité du chromosome X chez la Drosophile. Plusieurs chromosomes X tronqués (terminal deficiencies) et chromosomes Y dupliqués ont été utilisés pour selectivement éliminer le gène *Appl* et créer la lignée *Appl^d*. (Luo et al., 1992)

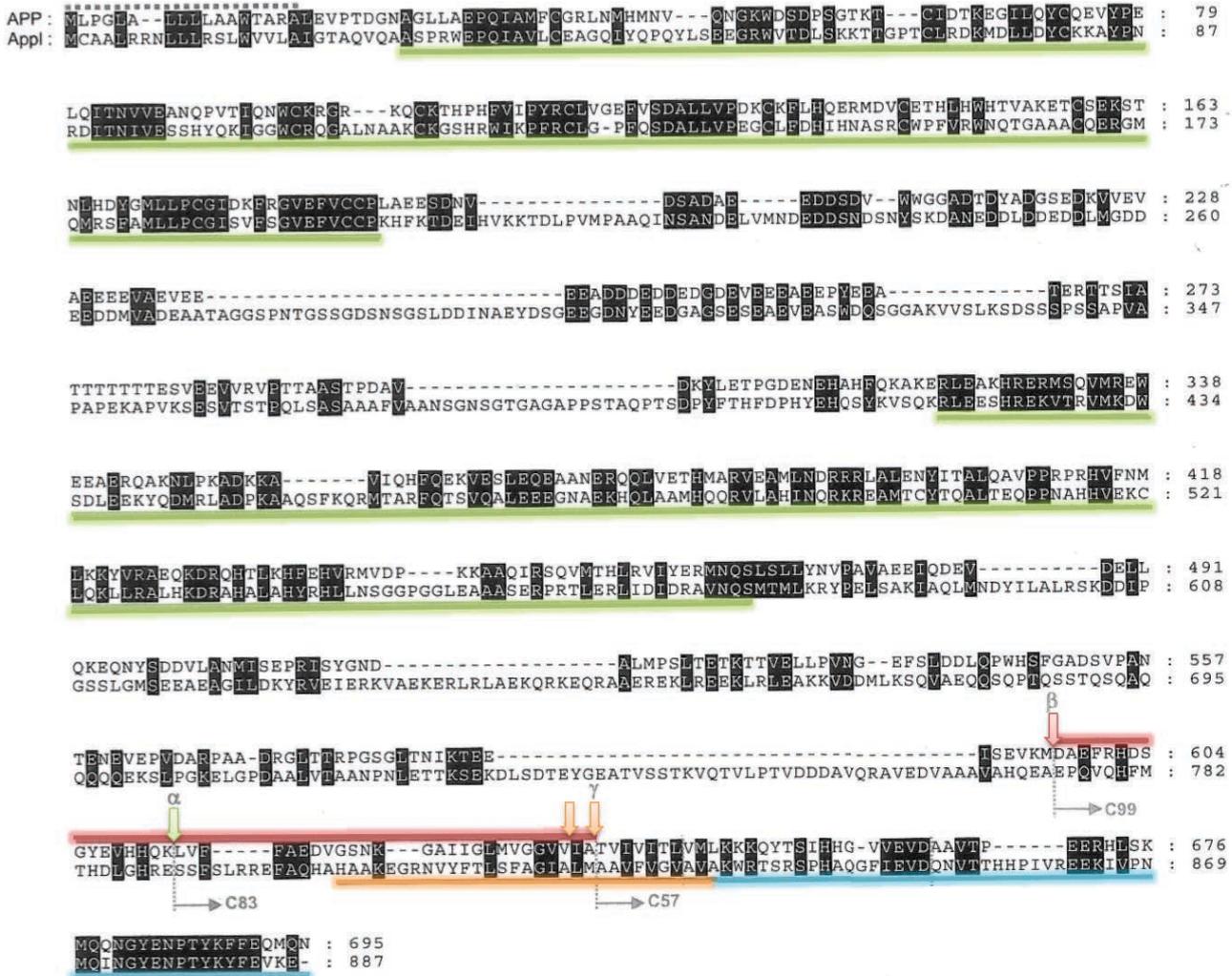


Figure 16. Homologies de séquence entre APP et APPL.

Trois régions présentent une forte homologie : les ectodomains E1 et E2, soulignés en vert, et la région intracellulaire soulignée en bleu. Le domaine transmembranaire est souligné en orange, la région Aβ surlignée en rouge. Les sites de coupures des sécrétases sont indiqués par des flèches.

APPL est impliquée dans le développement du système nerveux et la mémoire olfactive

Initialement, il a été montré qu'APPL est préférentiellement exprimée dans le système nerveux (Rosen et al., 1989), puis plus particulièrement dans les neurones en croissance durant la métamorphose de la drosophile (Martin-Morris and White, 1990; Torroja et al., 1996). En accord avec ce patron d'expression, APPL a été impliquée dans le développement du système nerveux, ce qui pourrait se faire via une interaction avec la voie Notch (Merdes et al., 2004). APPL joue un rôle dans la formation et le maintien des synapses neuro-musculaires via la voie Fascilin II (Ashley et al., 2005). APPL est présente

dans les axones, et sa surexpression perturbe le transport axonal (Torroja et al., 1999a). Ce phénotype est augmenté par l'inhibition de la kinésine, et aboli par la délétion du domaine cytoplasmique d'APPL. Il a donc été proposé qu'APPL soit un récepteur des kinésines via son domaine cytoplasmique (Gunawardena and Goldstein, 2001). Plus récemment, une protéine nommée Yata a été identifiée comme modulateur de la localisation subcellulaire d'APPL pendant le développement, son absence maintient APPL au niveau des somas (Sone et al., 2009). APPL est aussi un acteur de la voie conservée de « polarité cellulaire planaire » (PCP) : elle promeut l'arborisation axonale via une interaction de son domaine intracellulaire avec la kinase Abelson (Leyssen et al., 2005), contrôle le développement des CPs en interagissant avec le récepteur Frizzled, le cofacteur Wang et le ligand Wnt5 (Soldano et al., 2013). APPL pourrait aussi induire l'apoptose via dAPP-BP1 (*Drosophila* APP Binding Protein 1) (Kim et al., 2007). APLIP1 (APPL Interacting Protein 1), protéine qui interagit avec APPL via le motif NPTY, et présente une forte homologie avec JIP1b et JIP2 qui sont deux protéines liées à la voie de signalisation JNK, et responsables de la liaison d'APP à la kinésine et de son homodimérisation (Taru et al., 2002). Ces résultats suggèrent qu'APPL pourrait également être liée à cette voie, et former des homodimères. Enfin, dans les cellules photoréceptrices, il a démontré que l'expression d'APPL est régulée par la voie Ras1/MAPK via le facteur de transcription PntP2 (Mora et al., 2013).

Dans le cerveau adulte, APPL est particulièrement exprimée dans certains neurones isolés non identifiés, dans le complexe central, centre majeur du contrôle de la locomotion, et dans les CPs (Torroja et al., 1996). Au niveau des CPs, APPL est plus abondante dans les axones que dans les calices. En 2011, notre laboratoire a montré que l'inhibition d'APPL dans les CPs adultes permettait d'induire un défaut de LTM (Goguel et al., 2011).

APPL subit une protéolyse similaire à celle d'APP

Tout comme son homologue APP, APPL est une protéine transmembranaire rapidement clivée pour libérer un grand domaine N-terminal sécrété (Luo et al., 1990). L'homologue d'ADAM10 chez la drosophile est *kuzbanian* (Rooke et al., 1996). KUZ est impliqué dans les mécanismes d'inhibition latérale durant la neurogénèse, un processus médié par le clivage de Notch (Pan and Rubin, 1997). Le fait que KUZ clive APPL a récemment été confirmé (Carmine-Simmen et al., 2009). La drosophile possède également un second orthologue d'ADAM10 : *kuzbanian-like* (*kul*) qui est très peu exprimé et dont on ne connaît pas la fonction.

Pendant longtemps l'existence d'une voie amyloïdogénique chez la drosophile est restée hypothétique car aucun homologue de la β -sécrétase n'avait été identifié. De plus, la présence de dépôts amyloïdes chez la drosophile n'a jamais été observée dans des conditions physiologiques. En 2004, Greeve et al. ont coexprimé les protéines humaines APP et BACE1 afin de produire un modèle amyloïdogénique. Ils remarquent, en l'absence de BACE1, la présence d'un fragment de taille similaire au peptide A β , suggérant la présence d'une activité catalytique β chez la drosophile (Greeve et al., 2004). Plus récemment, la β -sécrétase de drosophile a été identifiée et nommée dBACE (Carmine-Simmen et al., 2009). Comme son homologue humain, dBACE est une protéase membranaire à asparte (Carmine-Simmen et al., 2009). Les mutants dBACE meurent précocement au cours du développement. Récemment, il a été montré que le clivage d'APPL par dBACE est nécessaire à la survie des cellules gliales (Bolkan et al., 2012).

L'homologue des présénilines chez la mouche est dPSN, identifié à l'origine pour son activité catalytique sur Notch (Boulianne et al., 1997; Hong and Koo, 1997; Struhl and Greenwald, 1999; Ye et al., 1999). Il a été démontré que dPSN est capable de cliver APP (Guo et al., 2003; Greeve et al., 2004), et plus récemment APPL (Carmine-Simmen et al., 2009). dPSN forme un complexe protéique avec les orthologues drosophile de la nicastrine, APH-1, PEN-2, suggérant que le complexe γ -sécrétase est conservé chez la mouche (Stempfle et al., 2010).

Ainsi, la drosophile possède des homologues pour les trois sécrétases et il apparaît qu'APPL est soumise à une maturation protéolytique similaire à celle d'APP (Poeck et al., 2012). Les sites exacts de clivage ne sont en revanche pas décrits ; et il a été proposé que la localisation des sites α et β pourraient être inversée par rapport à celle de l'APP humaine. Comme chez les mammifères, la coupure α apparaît largement majoritaire (Carmine-Simmen et al., 2009).

Modéliser la MA chez la drosophile

L'étude de la MA chez la drosophile a surtout été basée, tout comme chez la souris, sur l'étude de la toxicité des peptides A β . Des modèles amyloïdogéniques ont été générés en surexprimant soit directement des séquences humaines A β , soit une séquence APP associée aux sécrétases de la voie amyloïdogénique (Figure 17). La drosophile a également servi de modèle pour réaliser des cribles de facteurs génétiques et de composés modulateurs des

phénotypes induits par l'expression d'A β ou de mutations dans le gène *dPSN* (Iijima-Ando and Iijima, 2010; Moloney et al., 2010; Sarantseva and Schwarzman, 2011).

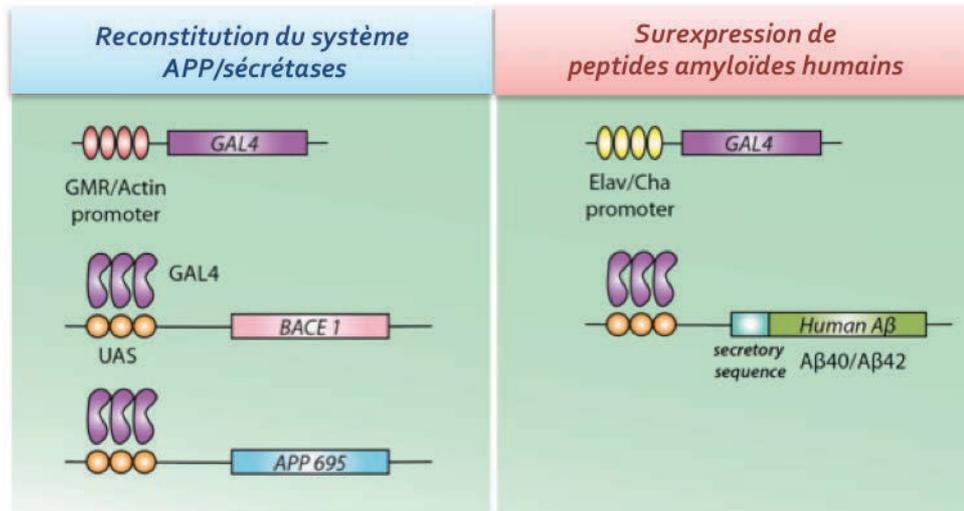


Figure 17. Les deux stratégies dominantes pour générer des modèles Drosophile de la MA.

Les modèles amyloïdogéniques reposent sur l'expression de séquences humaines. Panneau de gauche : expression conjointe d'une séquence APP et d'une sécrétase de la voie amyloïdogénique, panneau de droite : expression d'une séquence A β humaine (panneau de droite). (Sevalle, 2008)

Les modèles drosophile amyloïdogéniques

L'expression constitutive dans le système nerveux de drosophile d'A β 40 ou A β 42, fusionnés à un peptide signal de sécrétion, induit des phénotypes différents. L'expression d'A β 42 entraîne une déposition amyloïde et une neurodégénérescence, des défauts comportementaux, notamment un défaut d'apprentissage olfactif, et une réduction de la durée de vie (Iijima et al., 2004). L'expression d'A β 40 n'entraîne aucun de ces phénotypes, néanmoins une expression plus forte d'A β 40 affecte l'apprentissage olfactif, suggérant qu'à de fortes concentrations, A β 40 est capable d'altérer la transmission synaptique (Iijima et al., 2004). L'expression d'espèces mutantes d'A β 42 plus fibrillogènes induit une déposition amyloïde et une neurodégénérescence plus forte que celle d'A β 42 (Iijima et al., 2008). Dans ces modèles, l'apparition des dépôts amyloïdes est antérieure à la perte neuronale (Crowther et al., 2005). La drosophile permet ainsi de différencier *in vivo* la neurotoxicité des différentes espèces d'A β , et de la corrélérer à leur propension à s'agréger.

La surexpression conjointe d'APP et de BACE1 dans le système visuel de la mouche permet d'observer la présence de fragments CTFs et de peptides A β sécrétés, incluant les espèces A β 40 et A β 42, ce qui suggère que la γ -sécrétase de drosophile peut cliver APP en des sites identiques à ceux clivés par la γ -sécrétase humaine. Des plaques amyloïdes diffuses, une

neurodégénérescence progressive et une réduction de la durée de vie sont observées. Ces phénotypes sont aggravés si la surexpression d'APP et de BACE1 est associée à celle d'une forme mutée de la PSN (Greeve et al., 2004).

La recherche d'interactions génétiques

L'expression constitutive d'A β 42 dans l'œil de la drosophile induit un phénotype de type « rough eye » qui a été largement utilisé pour effectuer des cribles visant à caractériser des interactions génétiques fonctionnelles. Le test de plus de 2.000 lignées a permis d'identifier 23 gènes capables de modifier le phénotype « rough eye ». L'un d'entre eux portait une mutation capable de diminuer de près de 70 % le niveau d'A β 42 dans la rétine. Cette mutation était située dans la région régulatrice du gène *nep2*, suggérant que la Néprilysine 2 de drosophile est une peptidase capable de dégrader le peptide humain A β 42 (Finelli et al., 2004; Cao et al., 2008).

Le mutant *dPsn* présente une malformation de l'aile et du notum que l'on peut utiliser comme référence pour des cribles génétiques. 177 modulateurs de ce phénotype furent identifiés, ayant des rôles dans des processus aussi divers que la signalisation du calcium intracellulaire, la réponse au stress, le repliement des protéines, la transduction du signal, l'apoptose, et la régulation du cycle cellulaire. De façon intéressante, 53 de ces gènes interagissent génétiquement avec APP. Ces derniers sont principalement impliqués dans la modulation de la concentration intracellulaire de calcium (van de Hoef et al., 2009).

Le test de composés chimiques

La drosophile se place comme un bon modèle pour le test de composés chimiques. La barrière hémato-encéphalique (BHE) de la drosophile partage les caractéristiques principales de celle des mammifères. L'application de penetratine additionnée de celle de SH8, un inhibiteur de la fibrillogénèse, permet de diminuer la taille des dépôts amyloïdes induits par l'injection intra-abdominale d'A β (Schwarzman et al., 2005). L'application conjointe de penetratine et d'ApoE permet de sauver les déficits cognitifs (Sarantseva et al., 2009). Ces résultats montrent que la drosophile peut être utilisée pour la recherche de traitements thérapeutiques.

Des peptides A β endogènes ?

L'expression d'un fragment de séquence APPL localisé au niveau du domaine A β putatif (dA β), dans les cellules photorécepteurs de la mouche s'avéra capable d'induire des dépôts de type amyloïde, c'est-à-dire des dépôts réactifs à la ThioflavineS (Carmin-Simmen

et al., 2009). Ces dépôts s'accompagnent d'une dégénérescence neuronale. Ces résultats indiquent que les séquences d'APPL ainsi exprimées se comportent comme des peptides amyloïdes, et ils suggèrent la possibilité que la protéine APPL de drosophile puisse générer de tels peptides. Cette hypothèse est confortée par l'apparition de dépôts de type amyloïde lorsque les protéines APPL et dBACE sont conjointement surexprimées dans les photorécepteurs. Le fait que l'expression de peptides A β 42 humains ou de peptides amyloïdes putatifs de drosophile induisent des phénotypes similaires indiquent qu'ils pourraient avoir une fonction neurotoxique conservée au cours de l'évolution (Carmine-Simmen et al., 2009).

Parmi les 3 acides aminés qui diffèrent entre les séquences APP humaine et murine, et qui pourraient expliquer pourquoi les peptides de souris ne forment pas plaques amyloïdes, l'histidine13 est présente chez la drosophile. Il est possible cet acide aminé soit important pour la structure secondaire d'A β et son agrégation.

```

APPL: ESSFSLRREFAQHAHAAKEGRNVYFTLSFAGIALMAAVFVGV
    ++ F   + H +   + + A I I M V
hAPP: DAEFRHDSGYEVHHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
mAPP: DAEFGHDSGFVVRHQKLVFFAEDVGSNKGAIIGLMVGGVVIA
      *   *   *

APPL: AAVAHQEAEPQVQHFMTDLDLGHRESSFSLRREFAQHAHAAKEGRNVYFTLSFAGIALM-AAVFVGV
      A   ++ +V H   ++ F   FA   + K   A I I M V +
hAPP: DAEFRHDSGYEVHH-----QKLVF-----FAEDVGSNKG-----AIIGLMVGGVVIAT

```

Figure 18. Comparaison des séquences des peptides amyloïdes humains, souris et drosophile.

Un alignement sans *gaps* (haut) montre que sept résidus sont conservés entre les peptides d'origine humaine (hAPP) et de drosophile (APPL) dont l'histidine 13 (H), l'un des trois acides aminés qui diffèrent entre les séquences humaine et murine (mAPP, astérisques). Un alignement avec *gaps* montre 12 résidus conservés entre la région A β d'APP et dA β d'APPL. (Carmine-Simmen et al., 2009)

La surexpression d'APPL induit certains des phénotypes de la MA

La surexpression d'APPL dans le système nerveux de la mouche résulte en une déposition amyloïde, une neurodégénérescence et des déficits comportementaux liés à l'âge, ce qui correspond aux marqueurs de la MA chez l'homme. Ainsi, contrairement aux modèles murins, la drosophile peut développer une pathologie de type amyloïde à partir de la protéine endogène homologue d'APP. Ajouté au fait qu'elle semble produire des peptides dA β neurotoxiques, capables de former des plaques amyloïdes, cela suggère que la mouche

pourrait constituer un modèle approprié pour étudier les mécanismes moléculaires mis en jeu dans la formation des lésions cérébrales caractéristiques de la MA.

Projet de thèse

APPL est requis chez l'adulte pour la mémoire

L'utilisation du système GeneSwitch pour exprimer dans les CPs de mouches adultes des ARNi dirigés contre les ARNs *Appl* a permis de démontrer l'implication d'APPL dans la mémoire olfactive (Goguel et al., 2011). Cette étude fut la première réalisée en perte de fonction restreinte au stade adulte. Le fait que l'inhibition d'APPL soit suffisante pour induire un déficit de mémoire soutient l'hypothèse selon laquelle une perte de fonction APP pourrait intervenir dans les premiers stades de la MA.

Objectif 1 : Identifier les espèces APPL impliquées dans la mémoire

Dans la continuité de cette étude, une première partie de mon travail de thèse a été dédiée à l'identification du métabolite d'APPL et de ces domaines protéiques impliqués dans les processus mnésiques chez la drosophile. Pour cela, nous avons analysé les capacités de différentes formes mutantes d'APPL à sauver le déficit de mémoire induit par la perte de fonction de la protéine APPL endogène. Nous n'avons pu réaliser ces expériences chez un mutant null *Appl^d* puisque chez un tel mutant, l'absence d'APPL cause de légers défauts de développement des CPs (Li et al., 2004; Soldano et al., 2013). Nous avons donc utilisé des mouches hétérozygotes *Appl^d/+*, contexte génétique dans lequel le niveau de la protéine APPL endogène est réduit de manière constitutive. Ce travail a permis de démontrer que les formes sécrétées et membranaires d'APPL sont toutes deux impliquées dans la formation de la mémoire à court terme. Ce travail fait l'objet d'un article en révision au Journal of Neuroscience, et il constitue le premier chapitre de la section Résultats.

Objectif 2 : Etudier la voie amyloïdogénique chez le jeune adulte

Dans une seconde partie de ma thèse, nous avons voulu tirer avantage des outils génétiques présents chez la drosophile pour réaliser la première analyse fonctionnelle et restreinte chez l'adulte de la toxicité des peptides dA β sur la mémoire. Nous avons montré que favoriser la voie amyloïdogénique chez le jeune adulte n'affecte pas la mémoire olfactive. Nous avons ensuite analysé l'effet de la surexpression de la β -sécrétase ou celle de peptides amyloïdes de drosophile dA β , dans un contexte de perte de fonction partielle d'APPL. Nous avons démontré qu'il existe une interaction fonctionnelle négative pour la mémoire entre le gain de toxicité généré par les peptides amyloïdes d'une part, et la perte de fonction partielle

d'APPL, d'autre part. Nous proposons que les peptides A β agissent comme aggravateur de la perte de fonction d'APPL. Cette étude est présentée dans l'article qui constitue le chapitre 2 des Résultats.

MATERIELS ET METHODES

Elevage et maintenance des drosophiles

Les drosophiles sont élevées sur un milieu de culture standard contenant de la farine de maïs, de la levure, un fongicide et de l'eau. L'élevage se fait en conditions contrôlées : température à 18°C, humidité de 60% et cycle d'éclairage jour/nuit de 12/12 h. Les lignées sont maintenues dans des bouteilles de 5 cm de diamètre (175 ml) contenant du milieu de culture. Environ 80 adultes pondueurs sont transférés tous les 3 à 4 j sur un nouveau milieu et renouvelés tous les 15 ou 21 j.

Pour les expériences de comportement, nous croisons 50 femelles vierges avec 25 mâles que nous laissons à pondre dans ces conditions pendant 3 semaines. Durant les 3 semaines suivantes, nous disposons de jeunes adultes (la génération F1 issue de ce croisement) dont nous analysons la mémoire. Les drosophiles destinées aux extractions d'ARNm ou de protéines peuvent être élevées à 25°C dans des tubes en verre de 2 cm de diamètre ; les croisements sont alors réalisés avec 15 femelles vierges pour 8 mâles transférés sur milieu frais tous les 2 à 3 j pendant 15 j.

Afin de s'affranchir des effets du fond génétique sur nos analyses, nous réalisons une étape d'« outcross » avant d'utiliser une lignée. Notre souche de référence est *Canton Special* (*Cs* ou +). Nous possédons une souche mutante *white*¹¹⁸, au phénotype « yeux blancs » récessif (le gène *white* code pour une enzyme responsable de la pigmentation de l'œil) qui possède le même fond génétique que notre souche *Cs*. Tous les transgènes que nous avons utilisés sont couplés à un gène *mini-white* qui n'affecte pas l'expression du transgène mais permet de tracer sa présence dans le génome de la drosophile en se servant de la couleur de l'œil uniquement. Afin d'homogénéiser le fond génétique des lignées utilisées, chacune d'entre elles a été croisée à quatre fois successivement avec cette souche *white*¹¹⁸, puis rendue homozygote.

Expression de transgènes d'intérêts

Pour mesurer le niveau d'inhibition d'*Appl* induite par l'expression de ARNi, nous avons utilisé le pilote d'expression constitutif pan-neuronal *elav*. Pour contrôler l'expression

de transgènes d'intérêt chez la mouche adulte, nous avons utilisé les systèmes inductibles GeneSwitch et TARGET.

GeneSwitch. L'activateur de transcription GeneSwitch est dépendant de la présence de son ligand la progestérone. Pour induire l'expression d'un transgène sous le contrôle de cet activateur de transcription, des mouches âgées de 1 à 2 j sont placées sur un milieu de culture contenant du RU (RU 486 ou mifépristone, Sigma) à une concentration finale de 200 μM (Osterwalder et al., 2001; Mao et al., 2004). Le milieu de culture contenant le RU est préparé de 1 à 3 j avant de son utilisation à partir d'une solution mère préparée en diluant 1 g de RU dans 250 ml d'EtOH à 80% et conservée à 4°C. 48 h avant le conditionnement olfactif ou la congélation pour extraction d'ARN ou protéines, les mouches sont placées sur milieu RU dans une étuve à 18°C. Lorsque le test de mémoire est réalisé 24 h après le conditionnement, les mouches sont replacées sur milieu RU jusqu'au moment du test. Les groupes contrôles (sans RU) sont traités de la même façon mais placés sur milieu de culture normal.

Nous avons utilisé un pilote d'expression *MB-Switch* (*MBSw*) spécifique des lobes α , β et γ des CPs (Mao et al., 2004).

TARGET. L'inhibiteur GAL80^{ts} de l'activateur de transcription GAL4 est sensible à la température. Les inductions de transgènes sous contrôle de ce système sont réalisées à 30,5°C durant 3 j. Pour les expériences contrôles, les mouches sont placées à 18°C.

Nous avons utilisé le pilote d'expression tubGAL80^{ts} 238Y spécifique des CPs. Le patron d'expression de ce pilote couvre les lobes α , β et γ ainsi que les lobes primes.

Comportement

Conditionnement aversif olfactif

Comme il l'a été décrit dans l'introduction, nous utilisons au laboratoire un paradigme de conditionnement olfactif aversif de type Pavlovien. Le protocole a été mis au point dans le laboratoire de S. Benzer (Quinn et al., 1974) puis amélioré successivement par Tully et Quinn (1985), Tully et al. (1994) et Pascual et Prétat (2001).

Le principe de ce protocole est d'exposer des drosophiles à deux odeurs, successivement, en associant l'une des deux à une stimulation par de légers chocs électriques. La rétention de l'association artificiellement créée, ou mémoire, est testée en permettant aux drosophiles de choisir entre ces deux odeurs en l'absence des chocs électriques.

Les molécules odorantes que nous utilisons pour le conditionnement olfactif sont naturellement répulsives pour les drosophiles. Lorsque nous observons un comportement de fuite vis-à-vis de l'odeur qui a été associée aux chocs, cela signifie que l'association induite lors du conditionnement surpasse la réponse comportementale innée vis-vis de cette odeur. Nous utilisons l'octanol (OCT, Fluka 74878, Sigma-Aldrich) et le méthylcyclohexanol (MCH, Fluka 66360, Sigma-Aldrich) dilués dans environ 170 ml d'huile de vaseline pour obtenir une concentration finale de 360 mM et 325 mM respectivement. Les bouteilles d'odeur sont préparées au minimum 30 min avant leur utilisation.

Les expériences de comportement sont réalisées dans des pièces en surpression où l'air est purifié par du charbon actif, la température fixée à 25°C et l'humidité à 80%. Ces conditions permettent à la fois une meilleure évaporation des odeurs et une meilleure conductivité électrique. Les mouches et les bouteilles d'odeur sont placées dans la pièce de comportement 30 min avant le début de l'expérience.

Au moment du conditionnement, 30 à 40 mouches sont introduites dans chacun des six compartiments d'un barillet de conditionnement (Figure 19). Chaque compartiment est recouvert d'une grille électrifiable en cuivre. Des valves placées de part et d'autre du barillet permettent d'y faire passer un flux d'air contrôlé. Jusqu'à six barillets peuvent être utilisés simultanément. Les barillets sont branchés 1) à un générateur délivrant des chocs électriques de façon contrôlée et 2) à un système d'électrovannes assurant l'alternance entre un flux d'air sans odeur au débit constant et un flux d'air provenant de l'une ou l'autre des bouteilles d'odeur. L'ensemble est contrôlé par un programme informatique (Odeur14).

Un cycle de conditionnement dure 5 min 4 s et se décompose de la façon suivante :

- 90 s de période d'adaptation,
- 1 min pendant laquelle est présentée la première odeur (le stimulus conditionné, CS+) et sont délivrés 12 chocs électriques de 1 s 25 et 60 mV
- 45 s de repos, avec un flux d'air sans odeur,
- 1 min pendant laquelle est présentée la seconde odeur seule (le CS-),
- et 45 s de repos, avec un flux d'air sans odeur.

Dans le cas d'un protocole massé, 5 cycles de conditionnement sont répétés à la suite. Ce protocole dure environ 25 min. Dans le cas d'un conditionnement espacé, les 5 cycles sont séparés par un intervalle de repos de 15 min, le protocole dure alors 1 h 35. Chaque expérience est constituée de deux conditionnements inverses réalisés à la suite l'un de l'autre. Lors du premier conditionnement, le CS+ est l'OCT, lors du second le CS+ est MCH.

A la fin d'un conditionnement, les mouches sont transférées dans des tubes en verre si le test de mémoire est réalisé immédiatement, dans des tubes contenant du milieu de culture si le test de mémoire a lieu dans les heures suivantes, les mouches sont alors laissées au repos dans la pièce de conditionnement. Si le test de mémoire a lieu le lendemain, les mouches sont transférées dans des bouteilles contenant du milieu de culture puis replacées à 18°C ou 30,5°C selon le système inductible employé. Les mouches seront à nouveau transférées dans la pièce de comportement 30 min avant le début du test.

Test de mémoire

Le test de mémoire est réalisé grâce à un appareil en T-maze (Figure 19, Tully and Quinn, 1985) relié à une pompe à air et à deux bouteilles d'odeur contenant chacune soit l'OCT, soit le MCH. La concentration des molécules odorantes utilisée lors du test est la même que durant la phase de conditionnement. Le T-maze contient une sorte d'ascenseur qui permet grâce à un système coulissant de bloquer les mouches dans un compartiment que l'on peut descendre au niveau d'une chambre où convergent les deux odeurs. Deux compartiments identiques, de part et d'autre de cette chambre, sont remplis chacun par l'une des deux odeurs utilisées lors du conditionnement. Le débit d'air dans cette chambre est de 800 ml/min soit 400 ml/min par compartiment. Les drosophiles sont laissées libres de se déplacer entre ces deux compartiments durant 1 min, et ce, dans l'obscurité afin qu'elles ne puissent être guidées par des informations visuelles présentes dans l'environnement. Passé ce délai, la partie coulissante est remontée, empêchant tout passage d'un compartiment à l'autre. Les mouches présentes dans chacun des compartiments sont récupérées indépendamment, congelées puis comptées.

Calcul de l'indice de performance

La proportion de drosophiles ayant fui le CS+ permet de calculer un indice de performance (PI) pour l'ensemble du groupe qui reflète les capacités de mémoire du génotype considéré. Un indice de performance est la moyenne des indices λ de deux expériences réciproques. Les scores de mémoire peuvent s'étendre de -100 à 100. Un score de 0 est obtenu lorsque les drosophiles se répartissent de manière aléatoire.

$$PI = \frac{\lambda_{OCT} + \lambda_{MCH}}{2} \times 100 \quad \text{où} \quad \lambda_{CS} = \frac{N_{CS-} - N_{CS+}}{(N_{CS-} + N_{CS+})}$$

λ_{OCT} est l'indice de l'expérience utilisant OCT comme CS+

N_{CS-} est le nombre de drosophiles ayant fui le CS+

λ_{MCH} est l'indice de l'expérience utilisant MCH comme CS+

N_{CS+} est le nombre de drosophiles ayant approché le CS+



Figure 19. Matériel de conditionnement et de test.

A gauche, la machine à test ; à droite, le barillet de conditionnement avec six compartiments recouvert d'une grille électrifiable.

Test de l'olfaction

L'acuité olfactive varie d'un génotype à l'autre et peut être modifiée après l'application de chocs électriques (Préat, 1998). Lorsqu'un mutant de mémoire est identifié, ses capacités d'évitement des odeurs, ainsi que celles de ses contrôles génétiques, sont mesurées. Pour cela, on réalise un demi-cycle de conditionnement avec le CS+ puis on effectue immédiatement un test dans le T-maze en laissant aux drosophiles le choix entre le CS- et de l'air. Les odeurs étant répulsives, les mouches évitent le CS-. Si elles ne le font pas, le mutant de mémoire est invalidé. Dans le test de l'olfaction, le PI n'est composé que d'un λ . Ce test permet de tester à la fois l'acuité olfactive et les capacités locomotrices des mouches.

Test d'évitement aux chocs électriques

De même, il est nécessaire de vérifier que la sensibilité aux chocs électriques des mutants de mémoire identifiés est intacte. Pour cela, on laisse les mouches se répartir pendant une minute entre deux barillets placés face à face en position horizontale et reliés par une pièce en plastique. Un des deux barillets est relié au générateur électrique et délivre des chocs de même tension et à la même fréquence que lors du conditionnement. Deux expériences réciproques sont réalisées en alternant le barillet électrifié. Un PI est composé de deux λ . La réponse comportementale innée face aux chocs électriques est la fuite, les mouches doivent donc éviter le barillet électrifié. Si elles ne le font pas, le mutant de mémoire est invalidé. Ce protocole permet également de vérifier que les capacités locomotrices sont normales.

Biologie moléculaire

Extraction d'ARN, dégradation de l'ADN génomique et synthèse d'ADNc

Pour mesurer l'expression de gènes ou de transgènes, la première étape est de synthétiser des ADNc à partir d'ARNm. Des drosophiles sont congelées dans l'azote liquide, à raison de 50 femelles par génotype à analyser. Les ARN sont extraits des têtes de mouches uniquement. La mesure représente une bonne approximation de l'expression du gène dans l'ensemble du système nerveux central de la mouche. Les mouches sont congelées dans des tubes eppendorfs de 1,5 mL. Une simple étape de vortex permet de séparer les têtes des thorax. Les têtes sont récoltées grâce à des tamis en inox, placées dans un tube refroidi dans de la carboglace puis broyées. Les ARN totaux sont extraits du broyat en utilisant le kit RNeasy Plant (Qiagen) selon les instructions du fabricant. L'éluat sert pour une seconde élution afin d'augmenter le rendement de l'extraction. Lorsque nécessaire, les ARN totaux sont soumis à une étape de DNase. Après 15 min à 37°C, la DNase I (1:100, Biolabs) est inactivée par l'EDTA 0,5 M pendant 10 min à 75°C. La solution est nettoyée avec le kit RNA minielute cleanup (Qiagen) selon les recommandations fournies par le fabricant. La mesure de l'absorbance à 260 et 280 nm au spectrophotomètre permet d'établir la concentration des ARN extraits. 1,5 µg d'ARN totaux est utilisé pour la synthèse d'ADNc. Une étape d'incubation avec des amorces hexamères et oligodT est suivie d'une transcription inverse réalisée avec le kit Superscript III (Invitrogen) selon les instructions du fournisseur. Les ARN sont conservés à -80°C, les ADNc à -20°C.

« Polymerase Chain Reaction » quantitative (qPCR)

Les niveaux d'expression des gènes ou transgènes ont été estimés par la mesure en temps réel de la fluorescence incorporée pendant une étape d'amplification du pool d'ADNc synthétisé. L'amplification et la mesure sont automatisées grâce au Light Cycler 480 (Roche), le fluorophore que nous avons utilisé est le SYBR Green I Master (Roche). La tubuline α (CG1913) a servi de gène de référence. Les amorces spécifiques de chaque gène ont été établies grâce à l'application *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (Roche) et utilisées à une concentration de 0,5 µM dans un volume final de réaction de 10 µl. Chaque mesure d'expression est réalisée en triplicat et pour deux dilutions différentes afin de s'assurer de la linéarité de la réaction d'amplification. Les mélanges de réaction sont répartis dans une plaque de 96 puits. Après une étape de dénaturation de 5 min à 95°C, 40 cycles

constitués d'une étape d'hybridation-amplification de 30 s à 60°C puis une étape de dénaturation de 20 s à 95°C sont réalisés. Une étape finale permet de déterminer la courbe de fusion des amplicons afin d'estimer leur taille et leur spécificité.

Le logiciel Light Cycler 480 (Roche) détermine automatiquement le « crossing point » (Cp) de chaque réaction. Le Cp est inversement proportionnel à la quantité d'ADNc initial, il correspond au cycle où la fluorescence atteint le maximum de la dérivée seconde de la courbe d'amplification au terme des 40 cycles. Le Cp moyen des trois réplicats est utilisé pour calculer un ratio d'expression $2^{-\Delta C_p}$ où $\Delta C_p = C_{p_{\text{gène d'intérêt}}} - C_{p_{\text{tubuline}}}$. Les ratios d'expression servent pour les analyses statistiques, ils peuvent être normalisés par rapport à un génotype de référence pour des comparaisons quantitatives.

Extraction de protéines totale ou fractionnée

Après une induction équivalente à celle qui précède les expériences de comportement, des drosophiles sont congelées dans l'azote liquide, à raison de 50 femelles par génotype à analyser pour une extraction totale et entre 130-150 femelles pour une extraction fractionnée. Les protéines sont extraites des têtes de mouches uniquement.

Après avoir été séparées du corps par une étape de vortex, les têtes sont récupérées par passage sur tamis. Dans le cas d'une extraction totale, elles sont broyées dans un tampon de lyse (saccharose 100 mM, K_2HPO_4 40 mM, EDTA 30 mM, KCl 50 mM, Triton 0,25%, DTT 10 mM, PMSF 5 mM, inhibiteurs de protéases Complete Mini 150 mM (Roche)). Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 min à 4°C à 1000 rpm. La phase aqueuse est collectée, conservée à -80°C ou utilisée tout de suite.

Dans le cas d'une extraction fractionnée, les têtes de mouches sont broyées dans un tampon de lyse hypotonique (HEPES 10 mM à pH 7.4, 1 EDTA mM, inhibiteurs de protéases Complete Mini (Roche)). Les échantillons sont centrifugés deux fois successivement à 4°C et à 1000 rpm pendant 5 et 7 min. Les surnageants sont combinés et ultracentrifugés à 4°C à 50000 rpm pendant 1h30 (Beckman, rotor TLA100.3). Le surnageant contenant les protéines cytoplasmiques et solubles est collecté, et stocké à -80°C. Le culot contenant les protéines membranaires est solubilisé dans un tampon RIPA modifié (Tris 50 mM, Triton 1%, SDS 0,1%, sodium deoxycholate 0.5%, NaCl 150 mM, Na_3VO_4 1 mM, NaF 10 mM, β -glycerophosphate 10 mM, EDTA 1 mM, EGTA 1 mM, inhibiteurs de protéases Complete Mini (Roche)) durant 30 min à température ambiante, puis congelé à -80°C.

Western blot

Le protocole utilisé pour la migration sur gel et le transfert sur membrane de nitrocellulose est celui décrit par Sambrook et al. (1989). Les échantillons sont préparés à partir de 7,5 μL d'extraits protéiques, qui représentent environ 5 têtes de mouches, et dénaturés à 70°C pendant 10 min avant dépôt sur gel d'acrylamide (gradient 3-8%, Nupage, Life Technologies). A la fin de la migration, les protéines sont transférées sur membrane de nitrocellulose (Hybond, Amersham) en conditions semi-sèches durant 1 h à raison de 0,65 mA.cm⁻². La membrane est ensuite incubée dans une solution de blocage (PBS 1X, Tween20 0,2% lait écrémé 15%) pendant 1 h avec l'anticorps primaire sous agitation à 4°C jusqu'au lendemain. Le jour suivant, la membrane est rincée 5 fois 8 min (PBS 2X, Tween20 0,2% puis incubée avec l'anticorps secondaire pendant 1 h 30 sous agitation à température ambiante. Cinq étapes de lavage sont répétées avant révélation par ECL (LifeTechnologies). Le signal chemiluminescent est mesuré grâce à l'ImageQuant 4000 (GE Healthcare).

Les anticorps primaires et secondaires sont dilués à la concentration appropriée dans la solution de blocage. L'anticorps anti-APPL952 (Luo et al., 1990, dilution 1:10000) nous a été offert par J.-M. Dura (Université de Montpellier). La tubuline γ (QG-17, Sigma Aldrich, dilution 1:20000) est utilisée comme référence pour les extraits protéiques totaux et membranaires ; la tubuline α (T6199, clone DMA1, Sigma Aldrich, dilution 1:40000) pour les protéines solubles.

Le signal de chaque bande immunoréactive d'intérêt est mesuré en utilisant le logiciel ImageQuant TL (GE Healthcare). Après normalisation du signal APPL par le signal TUB pour chaque dépôt, la moyenne des ratios APPL/TUB sur une même membrane est calculée pour chaque génotype d'intérêt puis exprimée par rapport celle du génotype contrôle.

Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel Prism (GraphPad). Quel que soit le type d'expérience, la comparaison de deux génotypes est faite à l'aide d'un t-test de Student. La comparaison de trois génotypes ou plus est réalisée avec une ANOVA une-voie suivie d'un test post-hoc à comparaison multiple de Newman-Keuls. La *p-value* globale de l'ANOVA est donnée avec la valeur de la distribution de Fisher $F_{x,y}$ où x représente le degré de liberté du nombre de génotypes et y le degré de liberté de la distribution. La significativité a été fixée à la valeur standard $p < 0,05$. Sur les graphiques sont présentés les PI moyens \pm

l'erreur standard à la moyenne (SEM), les statistiques indiquées correspondent au test post-hoc le moins significatif selon la nomenclature classique.

RESULTATS

Partie 1. Identification des espèces APPL impliquées dans la mémoire olfactive chez la drosophile

Une première partie de mes travaux de thèse a été consacrée à l'identification de la ou des espèces dérivées d'APPL impliquées dans la mémoire olfactive à court-terme dans le but ultime de caractériser le rôle physiologique d'APPL dans la mémoire. APPL peut subir un traitement protéolytique semblable à celui de son orthologue mammifère APP. Nos travaux nous ont permis de démontrer que la forme secrétée d'APPL est impliquée dans la STM, en accord avec les études menées chez la souris. Nous avons aussi mis en évidence un rôle pour la forme entière non-protéolysée d'APPL, ce qui est en revanche inédit. Nos résultats suggèrent qu'il existe une interaction fonctionnelle entre ces deux formes d'APPL pour la mémoire. Cette étude a fait l'objet d'un article actuellement en révision au « Journal of Neurosciences » qui constitue la première partie de ce chapitre. Des résultats additionnels seront présentés dans une seconde partie. Enfin, dans la troisième partie, nous présenterons les résultats d'une analyse initiée pour identifier les domaines protéiques d'APPL requis pour la mémoire à court-terme, en utilisant plusieurs mutants dérivés de la forme mutante non-protéolysable d'APPL.

« La forme membranaire non-protéolysée de l'orthologue d'APP chez la drosophile est impliquée dans la formation de la mémoire »

Introduction

Dans une étude précédente, le laboratoire avait montré que l'inhibition de l'expression d'*Appl* dans les corps pédonculés (CPs) de la mouche adulte induisait un défaut de mémoire à long terme (LTM) (Goguel et al., 2011). Cette étude montrait pour la première fois que chez l'adulte, la seule perte de fonction d'APPL, en absence de surproduction de peptides amyloïdes, est suffisante pour altérer les processus mnésiques. Ces résultats suggéraient qu'une perte de fonction d'APP pourrait être impliquée dans le dysfonctionnement mnésique de la MA, du moins pendant les étapes précoces de la maladie.

Afin de mieux caractériser le rôle d'APPL dans les processus mnésiques, nous avons voulu identifier l'espèce d'APPL requise pour la mise en place de la mémoire. La stratégie que nous avons employée a été la suivante : diminuer le niveau d'APPL afin d'induire un déficit de mémoire et simultanément, exprimer l'une ou l'autre de ses espèces pour analyser leur capacité à compenser ce défaut.

Dans l'étude publiée en 2011, l'inhibition d'APPL était réalisée grâce à l'expression d'ARNi dans les CPs chez l'adulte (Goguel et al., 2011). Une telle stratégie n'était pas applicable à ce nouveau projet puisque la séquence de l'ARNi aurait ciblé aussi bien l'ARNm de l'APPL endogène que celui du métabolite APPL que nous souhaiterions surexprimer. Le niveau d'APPL endogène devait donc être diminué d'une autre manière. Il existe une lignée *Appl^d* portant une délétion du gène *Appl* (Luo et al., 1992). Nous avons généré une lignée de mouches portant cette délétion *Appl^d* et un pilote d'expression inductible spécifique des CPs, *MBSw*. Les mouches homozygotes *Appl^d;MBSw* présentent un défaut de réactivité aux chocs électriques qui les exclut de notre paradigme de mémoire aversive, mais les hétérozygotes *Appl^d/+;MBSw/+*, eux, réagissent aux chocs électriques comme des mouches sauvages. De telles mouches expriment un niveau d'APPL endogène réduit de moitié, ce qui induit un déficit de mémoire, et nous procure donc un outil adéquat pour réaliser notre étude. Certes, l'inhibition d'APPL est réalisée de manière constitutive et ubiquitaire, mais les analyses de sauvetage fonctionnel peuvent quant à elles être réalisées chez l'adulte de manière tissu-spécifique, dans les CPs.

Plusieurs études chez la souris ont indiqué un effet bénéfique de la forme sAPP α pour la mémoire (Meziane et al., 1998; Bour et al., 2004; Ring et al., 2007; Taylor et al., 2008). Notre primo-candidat a donc été le domaine sécrété d'APPL. Nous avons utilisé une forme mutante d'APPL, APPL^s, sécrétée de manière constitutive (le site de clivage α n'étant pas précisément identifié chez la drosophile, il n'existe pas de forme spécifique sAPPL α).

Résultats principaux

L'analyse des performances de mémoire des hétérozygotes *Appl^d/+;MBSw/+* a révélé un défaut de LTM, en accord avec l'étude précédemment publiée, mais aussi un défaut de mémoire à court-terme (STM), qui n'avait pas été observé avec l'expression d'ARNi (Goguel et al., 2011). Nous avons alors émis l'hypothèse que le niveau d'inhibition d'APPL était corrélé à la « gravité » du phénotype de mémoire : une inhibition modérée n'affecterait que les processus mis en jeu dans la formation de la LTM tandis qu'une inhibition plus forte

altérerait à la fois la LTM et la STM. Nous avons validé cette hypothèse en utilisant un nouvel ARNi, plus efficace pour inhiber l'expression d'*Appl* que ceux précédemment publiés. L'expression de ce nouvel ARNi dans les CPs de mouches adultes a permis d'observer un défaut de STM en plus d'un défaut de LTM.

La forme APPL^s a été générée en introduisant un codon stop dans la partie C-terminale du domaine extracellulaire d'APPL (Wentzell et al., 2012). L'expression d'APPL^s dans les CPs de mouches hétérozygotes *Appl^d/+;MBSw/+* permet de restaurer leurs performances de STM à un niveau sauvage. Ce résultat montre que la forme sécrétée d'APPL est impliquée dans la STM. Nous avons ensuite cherché à favoriser sa production à partir du pool d'APPL endogène disponible. Pour cela, nous avons surexprimé l'homologue drosophile de l' α -sécrétase, kuzbanian (KUZ) (Rooke et al., 1996; Carmine-Simmen et al., 2009), dans les CPs de mouches adultes. De façon surprenante, la surexpression de KUZ n'a pas permis d'améliorer les performances de STM des hétérozygotes *Appl^d/+;MBSw/+*, et qui est plus est, elle s'est avérée délétère. Les performances des mouches *Appl^d/+;MBSw/kuz* étaient significativement diminuées par rapport à celles des hétérozygotes *Appl^d/+;MBSw/+*. Nous avons alors analysé l'effet de la surexpression de KUZ sur la protéine APPL. Nous avons observé que les formes sécrétées d'APPL étaient plus abondantes, tandis que les formes membranaires non protéolysées étaient diminuées. Ce résultat atteste au niveau biochimique que la surexpression de KUZ entraîne une augmentation du clivage d'APPL. La surexpression d'APPL^s étant bénéfique pour la mémoire, nous avons écarté que l'effet délétère observé soit causé par l'augmentation des formes solubles, et privilégié l'hypothèse que le niveau d'APPL membranaire soit critique pour la mémoire. Afin de tester cette hypothèse, nous avons tiré avantage d'une forme mutante d'APPL, nommée « APPL secretion-defective », APPL^{sd}, chez qui une délétion de 34 acides aminés au niveau des sites de clivage α et β dans la séquence *Appl* empêche qu'elle soit protéolysée (Luo et al., 1992). L'expression d'APPL^{sd} dans les CPs d'hétérozygotes *Appl^d/+;MBSw/+* adultes permet de restaurer une STM sauvage, ce qui démontre qu'APPL^{sd} est, tout comme APPL^s, impliquée dans la formation de la STM, et suffisante pour compenser la perte partielle d'APPL.

En conclusion, nos résultats montrent que les formes membranaires et sécrétées d'APPL sont impliquées toutes deux dans les processus mnésiques, et suggèrent une interaction fonctionnelle entre ces deux formes. Notre étude apporte la première démonstration d'un rôle de la forme complète d'APPL dans la mémoire. Il est possible que ce type d'observation n'ait

pas été faite chez la souris à cause de la redondance fonctionnelle qui existe entre les trois homologues APP chez cet organisme.

Article 1

Submitted at Journal of Neurosciences, section Neurobiology of Disease

The full-length form of the *Drosophila* Amyloid Precursor Protein is involved in memory formation

Isabelle Bourdet, Thomas Preat*, and Valérie Goguel*

Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

Author contributions: I.B. T.P. and V.G. designed research; I.B. and V.G. performed research; I.B. and V.G. analyzed data; I.B. and V.G. wrote the paper.

*Corresponding authors:

Valérie Goguel, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: valerie.goguel@espci.fr

Thomas Preat, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: thomas.preat@espci.fr

Keywords: APPL; kuzbanian; α -secretase; *Drosophila*; short-term memory; mushroom bodies

Conflict of Interest: The authors declare no competing financial interests.

Acknowledgements: We thank Doris Kretzschmar (Oregon Health and Science University, Portland, USA) and Jean-Maurice Dura (Institut de Génétique Humaine, Montpellier, France) for the kind gift of fly lines. . We thank Aurélie Lampin-Saint-Amaux for technical help, and all members of our laboratory for fruitful discussions and critical reading of the manuscript.

T.P. was supported by a grant from the French Agence Nationale de la Recherche. I.B. was supported by the Région Ile-de-France.

Abstract

The amyloid precursor protein (APP) plays a central role in Alzheimer's disease (AD), a pathology that first manifests as a memory decline. Understanding the role of APP in normal cognition is fundamental in understanding the progression of AD, and mammalian studies have pointed to a role of secreted-APP α in memory. In *Drosophila*, we recently showed that APPL, the fly APP ortholog, is required for associative memory. In the present study, we aimed to characterize which form of APPL is involved in this process. We show that expression of a secreted-APPL form in the mushroom bodies, the center for olfactory memory, is able to rescue the memory deficit caused by APPL partial loss-of-function. We next assessed the impact on memory of the *Drosophila* α -secretase kuzbanian (KUZ), the enzyme initiating the non-amyloidogenic pathway that produces secreted-APPL α . Strikingly, KUZ overexpression not only failed to rescue the memory deficit caused by APPL loss-of-function, but even more, it exacerbated this deficit. We further show that in addition to an increase in secreted-APPL forms, KUZ overexpression caused a decrease of membrane-bound full-length species that could explain the memory deficit. Indeed, we observed that transient expression of a constitutive membrane-bound mutant APPL form is sufficient to rescue the memory deficit caused by APPL reduction, revealing for the first time a role of full-length APPL in memory formation. Taken together our data demonstrate that, in addition to secreted-APPL, the non-cleaved form is involved in memory, raising the possibility that secreted and full-length APPL act together in memory processes.

Introduction

The Amyloid Precursor Protein (APP) is a major actor of Alzheimer's disease (AD) (Zheng and Koo, 2011). APP is a transmembrane protein that undergoes two exclusive processing pathways: the non-amyloidogenic pathway initiated by the α -secretase produces a secreted APP form (sAPP α), while the amyloidogenic pathway leads to the production of amyloid- β peptides (A β) that can form toxic extracellular deposits in the brain of AD patients (Turner et al., 2003). For years, the amyloid hypothesis has placed A β at the center of the pathology etiology (Hardy and Selkoe, 2002).

To understand mechanisms underlying the pathology, it is fundamental to understand the role of APP in normal cognition, especially as disruption of APP normal function may contribute to AD (Neve et al., 2000). AD's first symptom is a decline of episodic memory (Förstl and Kurz, 1999), and several studies in mice reported that sAPP α enhances memory (Meziane et al., 1998; Ring et al., 2007). The physiological role of APP is particularly difficult to study because of its numerous proteolytic metabolites. Furthermore, functional studies of the APP pathway in rodents are limited by cause of redundancy due to three APP-related genes and the lethality of the triple knockout (Heber et al., 2000; Herms et al., 2004). In contrast, *Drosophila melanogaster* expresses a single non-essential APP ortholog, APP-Like (APPL). Importantly, APPL undergoes proteolytic pathways similar to that of APP, and the mammalian homologues of all secretases have been characterized in the fly (Poeck et al., 2012). Despite its relative simplicity, the fly brain is able to drive sophisticated behaviors. Particularly relevant for AD studies, *Drosophila* is extensively used as a model to study memory, and molecular processes at play are conserved from flies to mammals (McGuire et al., 2005). Neuronal structures underlying olfactory memory are well described. The mushroom bodies (MB), a prominent bilateral structure of the fly brain comprising 4,000

neurons, has been identified as the center of olfactory learning and memory (Heisenberg, 1998). We have recently shown that APPL is required for memory in the adult MB (Goguel et al., 2011), giving support to the hypothesis that APP loss-of-function might contribute to the appearance of memory deficits in AD.

In the present study, we aimed to characterize which APPL forms are involved in memory. We analyzed short-term memory (STM) after overexpression in the adult MB of either a constitutively secreted APPL form (APPL^s, Torroja et al., 1996), or *kuzbanian* (KUZ), the *Drosophila* homolog of the mammalian α -secretase ADAM10 (Rooke et al., 1996; Carmine-Simmen et al., 2009). While APPL^s overexpression was fully able to rescue the STM deficit caused by an APPL partial loss-of-function, KUZ overexpression strikingly turned out to exacerbate this deficit. We show that in this context, KUZ overexpression generated a decrease of membrane-bound full-length APPL, and further demonstrate that expression of a membrane-bound mutant form of APPL (Torroja et al., 1996) was sufficient to rescue the STM deficit caused by *Appl* inhibition. Altogether, our data point to a requirement for memory processes of both secreted and non-proteolyzed forms of APPL.

Materials and Methods

Drosophila stocks. All fly strains were outcrossed to a Canton Special genetic background. The *UAS-kuzbanian* (*kuz*) line was kindly provided by D. Kretzschmar (Carmine-Simmen et al., 2009). The *Appl^d;MBS_w* line was constructed using *Appl^d*-null mutant flies (Luo et al., 1992) and the Gal4-inducible MB247-Switch driver (Mao et al., 2004). The deficient *Appl^d w** line used for rescue experiments was a gift from J. M. Dura (Soldano et al., 2013). The *UAS-APPL*, *UAS-APPL^s* and *UAS-APPL^{sd}* lines are described in (Torroja et al., 1996, 1999b). The specific *Appl-RNAi* used in this study is the transformant #108312 from the Vienna *Drosophila* RNAi Center. For behavioral experiments, flies were

raised on standard medium at 18°C with 60% humidity under a 12 h light/dark cycle. As the *Appl* gene is located on the X chromosome, only females were analyzed in experiments that involved *Appl^d* genotypes. To induce transgene expression, the GeneSwitch system was used as described by Mao et al. (2004). A stock solution of RU486 (SPI-Bio) (10 mM in 80% ethanol) was mixed into molten food at 65°C to a final concentration of 200 µM.

Behavior experiments. Flies were trained with classical olfactory aversive conditioning protocols as described by Pascual and Pr at (2001). 1-2 day aged flies were kept on RU486-containing medium (RU) for 48 h prior to conditioning. Training and testing were performed at 25°C with 80% humidity. Conditioning was performed on samples of 30-40 flies with 3-octanol (>95% purity; Fluka 74878, Sigma-Aldrich) and 4-methylcyclohexanol (99% purity; Fluka 66360, Sigma-Aldrich) at 0.360 mM and 0.325 mM, respectively. Odors were diluted in paraffin oil (VWR International, Sigma Aldrich). Memory tests were performed with a T-maze apparatus (Tully and Quinn, 1985). Flies could choose for 1 min between two arms, each delivering a distinct odor. An index was calculated as the difference between the numbers of flies in each arm divided by the sum of flies in both arms. A performance index was then reported from the average of two reciprocal experiments with either octanol or methylcyclohexanol as conditioned stimulus. For odor avoidance tests after electric shock exposure, and response to electric shock, flies were treated as described by Pascual and Pr at (2001).

Quantitative PCR. Flies were raised at 25°C prior to total RNA extraction from 50 female heads with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Samples were submitted to DNase I treatment (Biolabs), and further reverse transcribed with oligo(dT)20 primers using the SuperScript III First-Strand kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. To specifically amplify the *Appl^s* cDNA, we used a primer (5'-CGCAGCGAGAAGCTCGATTA-3') that hybridizes at the site of the stop codon that was

introduced in the *Appl* sequence to generate the APPL^s construct (Torroja et al., 1996). We compared the level of the target cDNA to that of the *α-Tub84B* (CG1913) cDNA, which was used as a reference. Amplification was performed using a LightCycler 480 (Roche) in conjunction with the SYBR Green I Master (Roche). For each experiment, reactions were carried out in triplicate for two dilutions of each cDNA. Each data represents 2 to 3 independent experiments. Specificity and size of amplification products were assessed by melting curve analyses and agarose gel electrophoresis, respectively. Expression relative to the reference is expressed as a ratio ($2^{-\Delta C_p}$, where C_p is crossing point).

Protein analyses. Proteins were extracted from 140 female fly heads after 48 h of RU induction at 18°C. Protein extracts were fractioned in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (Roche) using sequential centrifugation as described in Lallemand et al. (2003). Samples were separated using SDS-PAGE gels containing a gradient of 3 to 8% acrylamide (Life Technologies) and transferred to nitrocellulose membrane (Amersham). Anti-*Appl* that binds to the APPL ectodomain (Ab952M, Torroja, 1996) was used at a dilution of 1:10,000. As loading controls, anti-tuby (QG-17, Sigma Aldrich, dilution 1:20,000) was used for membrane fractions, and anti-tub α (T6199, Sigma Aldrich, 1:40,000 dilution) for soluble fractions. Western blots were routinely developed using the ECL system (Life Technologies). Protein levels were quantified using ImageQuant TL software (GE Healthcare). Following normalization to loading controls, the levels of each APPL-reactive band was expressed as relative to the total amount of APPL detected in heterozygous *Appl^{d/+};MBSw/+* flies from the same Western blot experiment.

Statistical analyses. Memory scores are displayed as mean \pm standard error of the mean (SEM). To compare performance indexes from more than two groups, statistical analyses were performed through a 1-way ANOVA, followed by Newman-Keuls pairwise comparisons. Overall ANOVA *p*-value is given in the legends along with the value of the

corresponding Fisher distribution $F_{(x,y)}$, where x is the number of degrees of freedom for groups and y the total number of degrees of freedom for the distribution. Asterisks on the figure represent the least significant of the pairwise post-hoc comparisons between the genotype of interest and its controls, following the usual nomenclature. To compare memory scores of two groups, Student's t tests were used with $p < 0.05$ as a significance threshold. mRNA quantification measurements were analyzed from $2^{-\Delta C_p}$ ratios in the same way. For Western Blots analysis, the n represents the number of independent protein extraction performed. Each extraction was quantified one to three times on independent blots.

Results

Several reports have shown that APP is involved in memory in mammals. In *Drosophila*, we recently showed that APPL expression is required in the MB of young adults for long-term memory (LTM) formation (Goguel et al., 2011). Because there are numerous APPL metabolites, we aimed to identify which APPL species are involved in memory processes. To this end, we addressed whether the expression of distinct mutant forms of APPL could rescue the memory deficit observed in flies containing a reduced level of APPL protein.

To analyze memory, we used a classical conditioning of an odor avoidance response. In this paradigm, groups of flies are successively exposed to two distinct odors, only one of which is associated to electric pulses. Learning and short-term memory (STM) are assessed immediately and two hours, respectively, after one training cycle. Unlike STM, LTM is a consolidated memory whose formation relies on *de novo* protein synthesis (Tully et al., 1994), and it is assessed 24 h after 5-spaced training sessions.

In our previous work (Goguel et al., 2011), we knocked down APPL expression in adult MB by RNA interference (RNAi) using the conditional MB247-Switch driver (MBSw,

Mao et al., 2004) and *UAS-RNAi* transgenes. The MBSw driver encodes a Gal4-Switch fusion protein that becomes active when flies are fed with the RU486 (RU) ligand (Roman et al., 2001). However, this knock down strategy could not be used in the present study, as an *Appl* RNAi would target both endogenous *Appl* RNA and that resulting from the construct used to conduct rescue experiments. To circumvent this issue, we took advantage of *Appl^d*-null mutant flies (Luo et al., 1992), and generated *Appl^d* flies carrying the MBSw driver (*Appl^d;MBSw*). As previously described (Luo et al., 1992), homozygous *Appl^d;MBSw* flies exhibited an impairment in electric shock avoidance (Fig. 1A), as well as an apparent defect in learning that might result from the impairment in shock reactivity (Fig. 1B). These data are consistent with the fact that *Appl* deletion leads to subtle abnormal morphology of the MB lobes (Li et al., 2004), and a more recent study showing the role of APPL in brain wiring during development (Soldano et al., 2013). Interestingly, Soldano et al. (2013) showed that *Appl^d/+* heterozygous flies retaining one copy of the *Appl* wild-type gene do not undergo any developmental alteration. ~~detrimental for memory assessment~~. We thus hypothesized that *Appl^d/+;MBSw/+* heterozygous flies might constitute a tool to analyze the role of the APPL pathway in memory. As expected, measurement of *Appl* expression in *Appl^d/+;MBSw/+* fly heads by real-time PCR showed a strong reduction in *Appl* mRNA levels compared to wild-type (Fig. 1C). Interestingly, and in contrast to the *Appl^d;MBSw* null mutant, *Appl^d/+;MBSw/+* heterozygous flies showed wild-type shock reactivity (Fig. 1D), and also wild-type olfactory acuity (Fig. 1D). Furthermore, *Appl^d/+;MBSw/+* flies displayed a normal learning (Fig. 1E). These data suggest are consistent with the fact that unlike *Appl^d*-null mutant, flies expressing 40% of the wild-type level of *Appl* mRNA possess brain structures involved in olfactory learning and memory that are not affected.

To better characterize the memory deficit of *Appl^d/+;MBSw/+* heterozygous flies, we analyzed their LTM performances. Consistent with the results previously observed with flies

expressing specific *Appl* RNAi in adult MB (Goguel et al., 2011), *Appl^{d/+};MBSw/+* heterozygous flies exhibited an LTM impairment (Fig. 1F). In addition, *Appl^{d/+};MBSw/+* heterozygous flies exhibited a slight but significant STM defect compared to wild-type (Fig. 1G), whereas we previously observed that STM was not affected in *Appl RNAi-G3* and *Appl RNAi-42673* expressing flies (Goguel et al., 2011). In our previous study, APPL protein level was decreased by 39% in the MB as estimated by immunohistochemistry experiments (Goguel et al., 2011), whereas in the present work, *Appl* mRNA reduction in the fly head estimated by quantitative PCR (qPCR) was 60%, suggesting that APPL protein level in the MB is lower in *Appl^{d/+};MBSw/+* heterozygous flies than that previously achieved by RNAi induction. Thus, we hypothesized that the more APPL expression is reduced, the stronger the memory phenotypes observed. Indeed LTM is dependent on more advanced mechanisms than STM and is thus likely be more sensitive to disturbance (Dubnau and Tully, 1998). To further address this question, we used a more efficient *Appl-RNAi* construct (*RNAi-108312*) in order to achieve a higher extent of APPL loss-of-function. Efficiency of *Appl RNAi-108312* was assessed by driving its transcription with the pan-neuronal *elav-Gal4* driver. qPCR analyses revealed that *elav/+;+/RNAi-108312* flies express an *Appl/Tub* ratio of 0.055 ± 0.003 relative to the *elav/+* control, whereas previously published results indicated relative ratios of 0.13 for *elav/+;42673/+* and 0.25 for *elav/+;G3/+* flies (Goguel et al., 2011); showing that the *RNAi-108312* construct leads to a higher *Appl* knock-down than the RNAi constructs previously used. After 48 h of RU feeding, *MBSw/RNAi-108312* flies exhibited a STM deficit (Fig. 1H). This deficit was only observed when flies were fed with RU to induce RNAi expression (Fig. 1H), showing that it is specifically caused by RNAi induction in the adult MB. Therefore, decreasing APPL expression in the MB leads to a slight STM impairment that may not be observed when the reduction of *Appl* level is less substantial. The memory deficit is thus correlated to the extent of *Appl* level decrease in the MB. In conclusion, *Appl^{d/+};MBSw/+*

heterozygous flies should constitute an effective tool to conduct STM rescue experiments in APPL partial loss-of-function (LOF).

To validate this tool we first expressed a wild-type APPL form and analyzed its capacity to restore the STM deficit of the *App^l^{d/+};MBSw/+* heterozygous flies. APPL overexpression in the MB of wild type flies (*MBSw/APPL*) did not alter 2-hour memory (Fig. 2A). In contrast, APPL overexpression in the MB of *App^l^{d/+}* heterozygous flies (*App^l^{d/+};MBSw/APPL*) led to a significant increase of their memory score (Fig. 2B), showing that APPL overexpression in the MB leads to a rescue of the memory deficit caused by the deletion of one of the two copies of the *App^l* gene. We also observed a rescue of the memory phenotype in the absence of RU induction (Fig. 2B). We hypothesized that this phenotype resulted from the expression in the MB of the *UAS-APPL* transgene, as Gal4-Switch may be partially active in the absence of RU feeding. To assess *App^l* expression in the absence of RU induction, we performed qPCR analyses. We observed that without induction, *App^l^{d/+};MBSw/APPL* expressed a significant increase in *App^l* mRNA levels compared to that of *App^l^{d/+};+/APPL* flies (Fig. 2C). Considering that RNA was extracted from the whole brain, whereas APPL expression due to the activity of the Gal4-Switch in the absence of RU must take place in the MB, APPL level of expression in the MB is probably substantial.

As the mammalian secreted fragment produced from the α -secretase cleavage pathway, sAPP α , is the prime candidate for a role in memory (Meziane et al., 1998; Bour et al., 2004; Ring et al., 2007; Taylor et al., 2008), we next aimed to analyze the secreted-APPL form. For this purpose, we took advantage of a constitutively secreted APPL mutant protein. A stop codon introduced in the *App^l* sequence generates a 788 amino-acids soluble N-terminal fragment of APPL (APPL^s, Torroja et al., 1996) that has been put under control of the UAS expression system to allow for controlled expression patterns (*UAS-APPL^s*, Torroja et al., 1999). To assess APPL^s function in memory, we induced its expression in the MB for

48 h before conditioning and analyzed memory performances 2 h after. In flies expressing a wild-type level of endogenous APPL, overexpression of APPL^s in the MB (*MBSw/APPL^s*) led to a memory score that was not significantly different from that of control flies (Fig. 3A), showing that expression of a secreted APPL form in the MB of young adult flies does not increase their STM performances. We next analyzed whether APPL^s expression in the MB of APPL partial loss-of-function (LOF) flies could rescue their STM deficit. Heterozygous *AppI^d/+;+/APPL^s* flies showed a STM deficit (Fig. 3B), while APPL^s expression (*AppI^d/+;MBSw/APPL^s*) led to the restoration of a wild-type STM score (Fig. 3B). This result shows that a secreted form of APPL is involved in memory processes. We observed that *AppI^d/+;MBSw/APPL^s* flies that were not fed with RU also exhibited a wild-type STM score (Fig. 3B). To assess *AppI^s* expression in the absence of RU, we performed qPCR analyses. We observed an intrinsic level of *AppI^s* expression in the absence of Gal4 driver (Fig. 3C, *AppI^d/+;+/APPL^s*). In the presence of the MBSw driver, *AppI^d/+;MBSw/APPL^s* flies not fed with RU expressed a 5-fold increase of *AppI^s* mRNA compared to the control (Fig. 3C). This result indicates that in the absence of RU, the Gal4-Switch protein drives expression of the *UAS-APPL^s* transgene. In conclusion, expression of secreted APPL is able to rescue the memory deficit caused by the reduction of endogenous APPL.

To get further insight into secreted-APPL function in memory, we next analyzed the influence on memory of the overexpression of the *Drosophila* α -secretase, *kuzbanian* (KUZ) (Rooke et al., 1996), the enzyme that initiates the non-amyloidogenic pathway (Carmine-Simmen et al., 2009). Wild-type KUZ-expressing flies (*MBSw/kuz*) exhibited a memory score that was not significantly different from that of *+/kuz* control flies (Fig. 4A), showing that, similarly to APPL^s, KUZ overexpression in the MB of young adult flies has no impact on STM. We next studied whether overexpression of the α -secretase could rescue the memory deficit caused by APPL partial LOF. Unexpectedly, KUZ-expressing flies

(*Appl/+;MBSw/kuz*) showed a STM score significantly lower than their genetic controls (Fig. 4B). Thus, not only did KUZ overexpression fail to rescue the memory deficit caused by APPL partial LOF, but even more, it exacerbated this deficit. *Appl/+;MBSw/kuz* flies exhibited similar scores whether or not they were fed with RU for 48 h before conditioning (Fig. 4B). *Kuz* mRNA quantification indicated that KUZ is overexpressed in the absence of RU feeding (data not shown), showing that the Gal4-Switch driver is partially active under these conditions. *Appl/+;MBSw/kuz* flies fed with RU and tested immediately after conditioning exhibited wild-type learning (Fig. 4C). Their ability to avoid electric shocks as well as their olfactory acuity to each odor after electric shock exposure were unaffected (Fig. 4D), showing that they perceived the stimuli used for conditioning normally. Taken together, the data suggest that brain structures required for olfactory memory are not affected in *Appl/+;MBSw/kuz* flies.

We next verified the level of *kuz* overexpression in wild-type and APPL LOF genetic contexts. qPCR analyses revealed that the level of *kuz* mRNA was similar in *MBSw/kuz* and *Appl^d/+;MBSw/kuz* fly heads (Fig. 4E), indicating that the augmentation of the memory deficit observed in *Appl^d/+;MBSw/kuz* flies is not due to an increase in KUZ expression level compared to that of *MBSw/kuz* flies. Altogether, the data show that in an APPL partial LOF background, overexpression of the α -secretase, KUZ, is deleterious for memory. This result in apparent contradiction to that observed with APPL^S overexpression suggests that increasing secreted-APPL is not the only consequence of KUZ overexpression.

KUZ has substrates additional to APPL (Pan and Rubin, 1997; Lieber et al., 2002). However, because KUZ overexpression affects STM only when APPL levels are reduced, the results indicate that the memory deficit is caused by an interaction between KUZ and the APPL pathway. To get an insight into this interaction, we first analyzed whether the memory deficit induced by KUZ overexpression in *Appl^d/+;MBSw/kuz* flies was linked to a modulation

of endogenous *App1* expression. *App1* mRNA level was similar in *App1^{d/+};MBSw/+* and *App1^{d/+};MBSw/kuz* flies (Fig. 5A), showing that the mechanism by which KUZ exacerbates the memory deficit is not through modulation of *App1* transcription, but rather through APPL processing. We next analyzed the effect of KUZ overexpression on APPL protein steady state levels. Western blots were performed after fractionation of fly head lysates. As expected, the data show that APPL secreted forms revealed in the soluble fraction were enriched upon KUZ overexpression (Fig. 5B). In addition, we observed that full-length APPL (fl-APPL) levels present in the membrane fraction was decreased by 30% in *App1^{d/+};MBSw/kuz* compared to *App1^{d/+};MBSw/+* control flies (Fig. 5C). The results thus show that KUZ overexpression leads to a substantial increase of secreted APPL and a concomitant decrease of membrane-bound fl-APPL forms, suggesting that the deleterious impact on memory of the α -secretase overexpression is caused by a decrease of membrane fl-APPL protein.

To get an insight into the influence of fl-APPL on memory, we used the APPL^{sd} (APPL secretion-defective) mutant form of APPL (Torroja et al., 1996, 1999b). APPL^{sd} carries a short deletion encompassing the α and β cleavage sites that thus prevents its proteolytic cleavage. In consequence, APPL^{sd} is only expressed as a transmembrane protein. When overexpressed for 48 h in the MB of wild-type flies (*MBSw/APPL^{sd}*), APPL^{sd} mutant form did not affect STM (Fig. 6A). We next overexpressed APPL^{sd} in an APPL partial LOF genetic background. Interestingly, *App1^{d/+};MBSw/APPL^{sd}* flies fed with RU showed a STM performance significantly higher than that of *App1^{d/+};+/APPL^{sd}* flies, and undistinguishable from wild-type (Fig. 6B). In contrast, in the absence of RU-feeding, *App1^{d/+};MBSw/APPL^{sd}* flies exhibited scores that were undistinguishable from that of *App1^{d/+};+/APPL^{sd}* flies, and significantly lower than that of wild-type flies (Fig. 6B). Taken together, the data show that the induction of APPL^{sd} transient expression in the adult MB rescues the STM defect caused by *App1* reduction. In conclusion, APPL^{sd} is able to fully rescue the memory deficit caused by

APPL partial LOF, consistent with the fact that KUZ overexpression leads to decreased fl-membrane bound APPL, and is associated with an exacerbation of memory deficits.

We next aimed to analyze whether the distinct APPL forms used in this study could rescue the memory deficit caused by the reduction of endogenous APPL levels. As expected, we observed that overexpression of the wild-type APPL form could totally rescue the LTM impairment caused by APPL partial LOF (Fig. 7A). Expression of either the APPL^s (Fig. 7B) or the APPL^{sd} form also rescued the LTM deficit (Fig. 7C). The data thus indicate that secreted APPL and fl-membrane bound APPL are required to establish wild-type LTM.

Discussion

The majority of studies into APP biology have focused on pathogenic mechanisms. However it remains crucial to understand the normal physiological function of APP, especially as it is possible that APP loss-of-function elicits early cognitive impairment in AD patients. Here, we show that overexpression of secreted-APPL rescues the short-term memory deficit caused by a reduction of APPL level. In sharp contrast, overexpression of the α -secretase, KUZ, that produces sAPPL, exacerbates the memory impairment, a phenotype that is likely due to a deficit in full-length APPL protein level. Supporting this hypothesis, we further demonstrate that expression of a non-processed APPL mutant form is able to restore wild-type memory in an APPL partial loss-of-function background.

In the past, two main strategies have been considered as therapeutic approaches for AD. First, inhibition of the β - or γ -secretase has been utilized to achieve an inhibition of A β toxic production (Wolfe, 2008). However, reduction of A β production is not only an ineffective approach for AD (Callaway, 2012; Xia et al., 2012), but it can actually promote further pathology, as these enzymes have numerous substrates (Randall et al., 2010). A

second proposed approach has been to inhibit the amyloidogenic pathway by activating the α -processing of APP (Fahrenholz, 2007). In addition to the potential beneficial inhibition of the amyloidogenic pathway, the advantage of this type of approach is to also increase the production of sAPP α (Vincent and Govitrapong, 2011). Indeed, decreased cerebrospinal fluid sAPP α levels were found in familial and sporadic AD patients (Lannfelt et al., 1995; Sennvik et al., 2000), and correlated with poor memory performance in patients with AD (Almkvist et al., 1997; Fellgiebel et al., 2009). Thus, *in vitro* and *in vivo* studies indicate that sAPP α is down-regulated during AD. Numerous analyses have shown that sAPP α ectodomain has neurotrophic and neuroprotective effects in different models of neuronal stress (Mattson et al., 1993; Smith-Swintosky et al., 1994; Copanaki et al., 2010; Corrigan et al., 2011). In addition, sAPP α exhibits memory-enhancing properties. Intracerebroventricular infusion of anti-sAPP α serum was deleterious for memory, while that of sAPP α was beneficial (Meziane et al., 1998; Bour et al., 2004; Taylor et al., 2008). However, these studies relied on an exogenous excess of sAPP α and mechanisms of action and potential targets remained to be elucidated. With knock-in mice experiments, Ring et al. (2007) showed that sAPP α was sufficient to correct the impairments in spatial learning and long-term potentiation that are present in APP knockout (KO) mice. Here we show in *Drosophila* that sAPPL is able to fully rescue the STM deficit caused by a reduction in endogenous APPL level, thus establishing that an APPL soluble form plays a role in memory, and giving further support for a role of secreted forms in memory in mammal systems.

When the fly α -secretase, KUZ, was overexpressed in the adult MB, we did not observe any STM enhancing effect and, unexpectedly, KUZ overexpression in the MB of flies with an APPL partial loss-of-function exacerbated their memory impairment. Thus, KUZ overexpression was actually deleterious for memory, rather than beneficial. These results contrast with a previous study showing that overexpression of the mammalian α -secretase

ADAM10 in an AD mice model led to an increase in sAPP α , and was able to overcome APP related learning deficits (Postina et al., 2004). However, these studies showed that α -secretase activation has a positive impact on memory exclusively under conditions where human APP is overexpressed. In wild-type mice, results were not clear because overexpression of either the wild-type or an inactive form of the bovine ADAM10 altered learning and memory (Schmitt et al., 2006). Furthermore, ADAM10 has many substrates (Vincent and Checler, 2012), and no evidence was brought to link the memory deficit to APP.

Interestingly, we observed that KUZ overexpression decreases membrane non-proteolyzed APPL level, suggesting that its negative impact on memory in APPL LOF flies is linked to a reduction of non-proteolyzed APPL level. Therefore, strategies aiming at increasing APP α -cleavage may not be appropriate as this could provoke a decrease of full-length APP (fl-APP) levels that might be deleterious to APP function.

Transient expression of a constitutive membrane-bound mutant APPL has the capacity to fully rescue the STM deficit caused by APPL partial loss-of-function. Thus, both sAPPL and fl-APPL appear to be involved in memory processes. This is in apparent contradiction with the observation that mammalian sAPP α was sufficient to correct spatial learning deficit of APP KO mice (Ring et al., 2007). However, in this study APP-like proteins APLP1 and ALPL2 were preserved, and as it is known from double KO analyses that the three APP homologs exert functional redundancy (Anliker and Müller, 2006), they may have compensated for the loss of essential fl-APP functions. In consequence, one cannot attribute the memory function exclusively to sAPP α .

If both fl-APPL and sAPPL carry the capacity to restore wild-type STM in APPL partial LOF flies, it is puzzling to observe that KUZ overexpression in this genetic context is deleterious for memory. Indeed, in addition to causing a decrease in fl-APPL, KUZ

overexpression leads to a concomitant increase in sAPPL that should be able to complement fl-APPL deficiency. We suggest that in this context, fl-APPL level is below threshold so that even high levels of sAPPL cannot restore a wild-type memory. This hypothesis is supported by protein quantification experiments showing a 30% decrease in fl-APPL level. Because APPL was extracted from the whole brain, whereas KUZ overexpression was only driven in a subset of neurons, the effective fl-APPL decrease in the MB must be much higher than 30%.

In mammalian cells under steady state levels, about 10% of APP is located at the plasma membrane (Thinakaran and Koo, 2008). APP has long been suggested to act as a cell-surface receptor (Kang et al., 1987), however, such a function has not been unequivocally established. Several reports have shown that APP exists as homodimers (Scheuermann et al., 2001; Soba et al., 2005; Dahms et al., 2010). Cis-dimerization of APP would represent a potential mechanism for a negative regulation of APP functions and a concomitant impact on A β generation via an increase in β -processing (Kedikian et al., 2010; Scheuermann et al., 2001; Hashimoto et al., 2003; Lu et al., 2003; Lefort et al., 2012). Interestingly, it has been suggested that APP is a receptor for sAPP α as its binding could disrupt APP dimers (Gralle et al., 2009).

In *Drosophila*, Wentzell et al. (2012) reported that the secreted N-terminal ectodomain of APPL acts as a soluble ligand for neuroprotective functions. Furthermore, co-immunoprecipitation experiments from transfected *Drosophila* Kenyon cells revealed a physical interaction between fl-APPL and sAPPL, suggesting that sAPPL could be a ligand for fl-APPL (Wentzell et al., 2012). Our data showing the involvement of both membrane fl-APPL and sAPPL in memory are consistent with the hypothesis that sAPPL could be a ligand for its own fl-APPL precursor.

In conclusion, our data reveal for the first time a role for membrane fl-APPL in

memory, opening new questions about APP non-pathological functions and relations between secreted and full-length forms in memory processes.

References

- Almkvist O, Basun H, Wagner SL, Rowe BA, Wahlund LO, Lannfelt L (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein mirror cognition in a Swedish family with Alzheimer disease and a gene mutation. *Arch Neurol* 54:641–644.
- Anliker B, Müller U (2006) The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3:239–246.
- Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H (2009) The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* 23:156–172.
- Beglopoulos V, Shen J (2006) Regulation of CRE-dependent transcription by presenilins: prospects for therapy of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 27:33–40.
- Bignante EA, Heredia F, Morfini G, Lorenzo A (2013) Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34:2525–2537.
- Bour A, Little S, Dodart JC, Kelche C, Mathis C (2004) A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiol Learn Mem* 81:27–38.
- Bourdet I, Pr at T, Goguel V (2014) The full-length form of the *Drosophila* Amyloid Precursor Protein is involved in memory formation. Submitted.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82:239–259.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE1 is the major beta-secretase for generation of A β peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4:233–234.
- Callaway E (2012) Alzheimer's drugs take a new tack. *Nature* 489:13–14.
- Carmine-Simmen K, Proctor T, Tsch ape J, Poeck B, Triphan T, Strauss R, Kretschmar D (2009) Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* 33:274–281.
- Carter J, Lippa CF (2001) Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 1:733–737.
- Chami L, Checler F (2012) BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and β -amyloid production in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 7:1–15.
- Chen Y, Huang X, Zhang Y, Rockenstein E, Bu G, Golde TE, Masliah E, Xu H (2012) Alzheimer's β -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β -amyloid. *J*

- Neurosci 32:11390–11395.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672–674.
- Cole SL, Vassar R (2007) The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* 2:22.
- Copanaki E, Chang S, Vlachos A, Tschäpe J-A, Müller UC, Kögel D, Deller T (2010) sAPP α antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Mol Cell Neurosci* 44:386–393.
- Corrigan F, Pham CLL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, van den Heuvel C, Cappai R (2011) The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res* 1378:137–143.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Miranda E, Page R, Curry JA, Duthie FAI, Gubb DC, Lomas DA (2005) Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132:123–135.
- Dahms SO, Hoefgen S, Roeser D, Schlott B, Gührs K-H, Than ME (2010) Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5381–5386.
- Dawkins E, Small DH (2014) Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*:n/a–n/a.
- Dislich B, Lichtenthaler SF (2012) The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front Physiol* 3:8.
- Dubnau J, Tully T (1998) Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:407–444.
- Fahrenholz F (2007) Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr Alzheimer Res* 4:412–417.
- Fang L, Duan J, Ran D, Fan Z, Yan Y, Huang N, Gu H, Zhu Y (2012) Amyloid- β depresses excitatory cholinergic synaptic transmission in *Drosophila*. *Neurosci Bull* 28:585–594.
- Fellgiebel A, Kojro E, Müller MJ, Scheurich A, Schmidt LG, Fahrenholz F (2009) CSF APPs alpha and phosphorylated tau protein levels in mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 22:3–9.
- Finelli A, Kelkar A, Song H-J, Yang H, Konsolaki M (2004) A model for studying Alzheimer's A β 42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* 26:365–375.
- Förstl H, Kurz A (1999) Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249:288–290.
- Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002) Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1381–1389.
- Ghosh AK, Brindisi M, Tang J (2012) Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's

- disease: β -Secretase inhibitor drugs. *J Neurochem* 120:71–83.
- Goguel V, Belair A-L, Ayaz D, Lampin-Saint-Amaux A, Scaplehorn N, Hassan BA, Preat T (2011) *Drosophila* Amyloid Precursor Protein-Like Is Required for Long-Term Memory. *J Neurosci* 31:1032–1037.
- Graeber MB, Kösel S, Grasbon-Frodl E, Möller HJ, Mehraein P (1998) Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1:223–228.
- Gralle M, Botelho MG, Wouters FS (2009) Neuroprotective Secreted Amyloid Precursor Protein Acts by Disrupting Amyloid Precursor Protein Dimers. *J Biol Chem* 284:15016–15025.
- Greeve I, Kretschmar D, Tschäpe J-A, Beyn A, Brellinger C, Schweizer M, Nitsch RM, Reifegerste R (2004) Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J Neurosci* 24:3899–3906.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M, Chiba T, Kanekura K, Yamada M, Tsukamoto E, Kouyama K, Terashita K, Aiso S, Lin A, Nishimoto I (2003) Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J Neurochem* 84:864–877.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüllicke T, Kretschmar H, Koch C von, Sisodia S, Tremml P, Lipp H-P, Wolfer DP, Müller U (2000) Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members. *J Neurosci* 20:7951–7963.
- Heisenberg M (1998) What do the mushroom bodies do for the insect brain ? An introduction. *Learn Mem* 5:1–10.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23:4106–4115.
- Holsinger RMD, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (2002) Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51:783–786.
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14:419–427.
- Iijima K, Chiang H-C, Hearn SA, Hakker I, Gatt A, Shenton C, Granger L, Leung A, Iijima-Ando K, Zhong Y (2008) Abeta42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. *PloS One* 3:e1703.
- Iijima K, Iijima-Ando K (2008) *Drosophila* models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42. *J Alzheimers Dis* 15:523–540.

- Iijima K, Liu H-P, Chiang A-S, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y (2004) Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6623–6628.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5:52–77.
- Jonsson T et al. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488:96–99.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736.
- Kedikian G, Heredia F, Salvador VR, Raimunda D, Isoardi N, Heredia L, Lorenzo A (2010) Secreted amyloid precursor protein and holo-APP bind amyloid beta through distinct domains eliciting different toxic responses on hippocampal neurons. *J Neurosci* 88:1795–1803.
- Keene AC, Waddell S (2007) *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 8:341–354.
- Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Dickson DW, Johnson KA, Petersen LE, McDonald WC, Braak H, Petersen RC (2003) Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1087–1095.
- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang H-C, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee H-K, Wong PC (2005) BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693–11709.
- Lallemant D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI (2003) NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* 17:1090–1100.
- Lannfelt L, Basun H, Vigo-Pelfrey C, Wahlund LO, Winblad B, Lieberburg I, Schenk D (1995) Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation. *Neurosci Lett* 199:203–206.
- Lefort R, Pozueta J, Shelanski M (2012) Cross-linking of cell surface amyloid precursor protein leads to increased β -amyloid peptide production in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:10674–10685.
- Li R, Lindholm K, Yang L-B, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y (2004a) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3632–3637.
- Li Y, Liu T, Peng Y, Yuan C, Guo A (2004b) Specific functions of *Drosophila* amyloid precursor-like protein in the development of nervous system and nonneural tissues. *J Neurobiol* 61:343–358.
- Lieber T, Kidd S, Young MW (2002) Kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* 16:209–221.

- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 3:460–464.
- Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH (2003) Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J Neurochem* 87:733–741.
- Luo L, Martin-Morris LE, White K (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849–3861.
- Luo L, Tully T, White K (1992) Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene. *Neuron* 9:595–605.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4:231–232.
- Mao Z, Roman G, Zong L, Davis RL (2004) Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:198–203.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243–254.
- McGuire SE, Deshazer M, Davis RL (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol* 76:328–347.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683–12688.
- Neve RL, McPhie DL, Chen Y (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 886:54–66.
- Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R (2007) BACE1 gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 26:134–145.
- Osterwalder T, Yoon KS, White BH, Keshishian H (2001) A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12596–12601.
- Pan D, Rubin GM (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271–280.
- Pascual A, Pr at T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
- Poeck B, Strauss R, Kretschmar D (2012) Analysis of amyloid precursor protein function in *Drosophila melanogaster*. *Exp Brain Res* 217:413–421.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C,

- Blessing M, Flamez P, Dequenue A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456–1464.
- Randall AD, Witton J, Booth C, Hynes-Allen A, Brown JT (2010) The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology* 59:243–267.
- Refolo LM, Eckman C, Prada CM, Yager D, Sambamurti K, Mehta N, Hardy J, Younkin SG (1999) Antisense-induced reduction of presenilin 1 expression selectively increases the production of amyloid beta42 in transfected cells. *J Neurochem* 73:2383–2388.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Muller UC (2007) The Secreted γ -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APPs Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice. *J Neurosci* 27:7817–7826.
- Roberds SL et al. (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10:1317–1324.
- Rockenstein E, Mante M, Alford M, Adame A, Crews L, Hashimoto M, Esposito L, Mucke L, Masliah E (2005) High beta-secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid-beta levels: implications for the treatment of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:32957–32967.
- Roman G, Endo K, Zong L, Davis RL (2001) P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12602–12607.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273:1227–1231.
- Sambamurti K, Suram A, Venugopal C, Prakasam A, Zhou Y, Lahiri DK, Greig NH (2006) A Partial Failure of Membrane Protein Turnover May Cause Alzheimers Disease: A New Hypothesis. *Curr Alzheimer Res* 3:81–90.
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.
- Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz F, Schroeder A (2006) Over-expression of two different forms of the alpha-secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 175:278–284.
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 278:169–172.
- Shaked GM, Kummer MP, Lu DC, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH (2006) Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB J* 20:1254–1256.
- Shimada T, Kato K, Kamikouchi A, Ito K (2005) Analysis of the distribution of the brain cells of the

- fruit fly by an automatic cell counting algorithm. *Physica* 350:144–149.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 402:537–540.
- Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Craddock SD, Culwell AR, Rydel RE, Mattson MP (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J Neurochem* 63:781–784.
- Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Müller U, Kins S, Beyreuther K (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24:3624–3634.
- Sola Vigo F, Kedikian G, Heredia L, Heredia F, Añel AD, Rosa AL, Lorenzo A (2009) Amyloid-beta precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid beta through Go protein activation. *Neurobiol Aging* 30:1379–1392.
- Soldano A, Okray Z, Janovska P, Tmejová K, Reynaud E, Claeys A, Yan J, Atak ZK, De Strooper B, Dura J-M, Bryja V, Hassan BA (2013) The Drosophila Homologue of the Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Modulator of Wnt PCP Signaling. *PLoS Biol* 11:e1001562.
- Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin Anat* 8:429–431.
- Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC (2008) Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis* 31:250–260.
- Thathiah A, De Strooper B (2011) The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:73–87.
- Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615–29619.
- Torroja L, Luo L, White K (1996) APPL, the Drosophila member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons. *J Neurosci* 16:4638–4650.
- Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999) The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:7793–7803.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila. *Cell* 79:35–47.
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster. *J Comp Physiol* 157:263–277.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70:1–32.

- Van Nostrand WE, Melchor JP, Keane DM, Saporito-Irwin SM, Romanov G, Davis J, Xu F (2002) Localization of a fibrillar amyloid beta-protein binding domain on its precursor. *J Biol Chem* 277:36392–36398.
- Vassar R et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735–741.
- Vassar R (2001) The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17:157–170.
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC (2009) The γ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J Neurosci* 29:12787–12794.
- Vincent B, Checler F (2012) α -Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins. *Curr Alzheimer Res* 9:140–156.
- Vincent B, Govitrapong P (2011) Activation of the α -secretase processing of A β PP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2:75–94.
- Wentzell JS, Bolkan BJ, Carmine-Simmen K, Swanson TL, Musashe DT, Kretschmar D (2012) Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46:78–87.
- Wolfe MS (2008) Selective amyloid- β lowering agents. *BMC Neurosci* 9:S4.
- Xia W, Wong ST, Hanlon E, Morin P (2012) γ -Secretase modulator in Alzheimer's disease: shifting the end. *J Alzheimers Dis* 31:685–696.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533–537.
- Yang L-B, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang X-L, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, Li R, Shen Y (2003) Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease. *Nat Med* 9:3–4.
- Zhao X-L, Wang W-A, Tan J-X, Huang J-K, Zhang X, Zhang B-Z, Wang Y-H, YangCheng H-Y, Zhu H-L, Sun X-J, Huang F-D (2010) Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in *Drosophila*. *J Neurosci* 30:1512–1522.
- Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6:27.

Figures

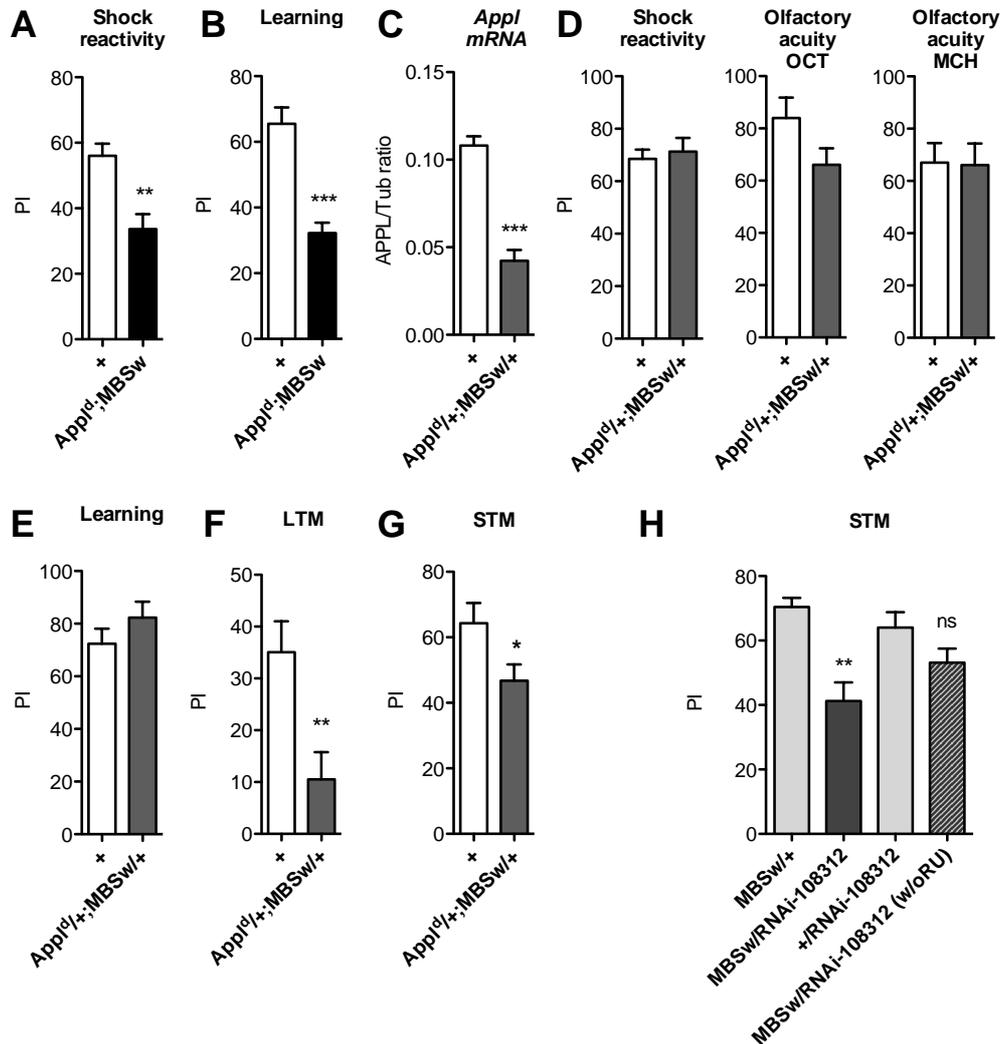


Figure 1. APPL loss-of-function induces a short-term memory deficit. **A, B**, Analysis of *App^l^d;MBSw* homozygous flies. **A**, *App^l^d;MBSw* flies exhibit a defect in shock reactivity (t test, ** $p < 0.005$, $n = 6$). **B**, *App^l^d;MBSw* flies display a learning impairment. To assess learning ability, flies were submitted to one cycle training and tested immediately after (t test, *** $p < 0.0001$, $n = 8$). **C-G** Analysis of *App^l^d;+/MBSw/+* heterozygous flies. **C**, Quantitative PCR analysis of *Appl* expression. Total RNA was extracted from wild-type (+) and *App^l^d;+/MBSw/+* fly heads, and further reverse transcribed with oligo(dT) primers. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results shown are ratios to the reference (t test, *** $p < 0.0001$, $n = 3$). **D**, Heterozygous *App^l^d;+/MBSw/+* flies display wild-type shock reactivity (t test, $p = 0.6622$, $n = 6$), and wild-type olfactory acuity (octanol, t test, $p = 0.0954$, $n = 8$; methylcyclohexanol, t test, $p = 0.9390$, $n \geq 7$). **E**, Learning is not affected. Learning was assessed by testing flies immediately after one cycle training (t test, $p = 0.2717$, $n \geq 7$). **F**, *App^l^d;+/MBSw/+* flies exhibit an LTM deficit. To assess LTM, flies were submitted to 5-spaced cycles, and memory was tested 24 h later (t test, ** $p < 0.005$, $n \geq$

15). **G**, *App^{l^d/+};MBSw/+* flies exhibit an STM deficit. Flies were submitted to one cycle training and tested 2 h later (t test, * $p < 0.05$, $n \geq 11$). **H**, Analysis of *App^l-RNAi* expressing flies (*MBSw/RNAi-108312*). Unless indicated (w/o RU), flies were fed with RU for 48 h before conditioning. To assess STM, flies were submitted to one cycle training and tested 2 h later. *MBSw/RNAi-108312* flies exhibit an STM impairment ($F_{(3,47)} = 7.51$, *** $p < 0.001$, $n \geq 8$). *MBSw/RNAi-108312* flies not fed with RU display performances that were not different from the controls (Newman–Keuls post-hoc *MBSw/108312* w/o RU vs +/108312 $p > 0.05$). Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index, OCT octanol, MCH, methycyclohexanol.

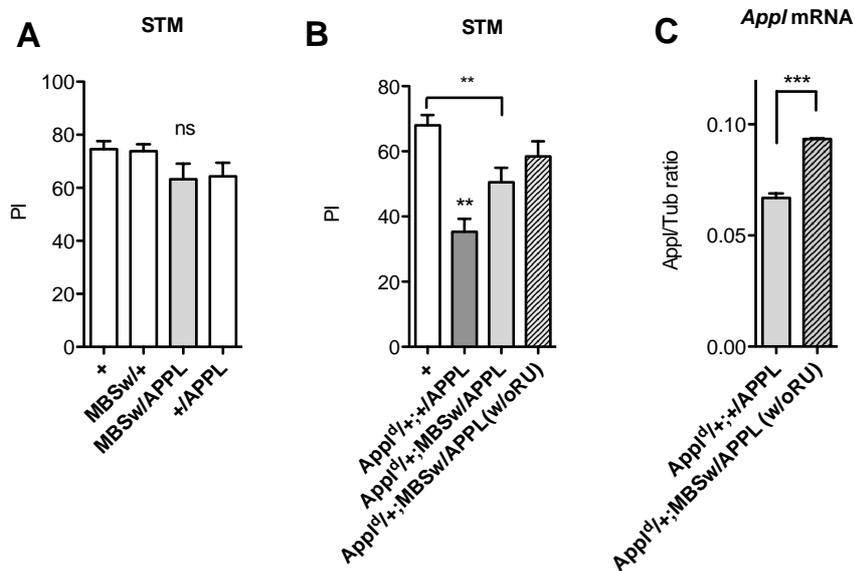


Figure 2. Expression in the MB of wild-type APPL rescues the memory deficit caused by APPL partial loss-of-function. **A**, **B**, Unless indicated (**B**, w/o RU), flies were fed with RU for 48 h, and submitted to one cycle training. Memory was tested 2 h later. **A**, *MBSw/APPL* flies exhibit STM performances similar to control groups ($F_{(3,55)} = 2.14$, $p = 0.1060$, $n \geq 11$). **B**, Rescue experiments. *App^{l^d/+};MBSw/APPL* flies display a score significantly higher than that of *App^{l^d/+};+/APPL* flies ($F_{(3,89)} = 13.04$, *** $p < 0.0001$, $n \geq 19$), and lower than wild-type (+) control flies (Newman–Keuls post-hoc, ** $p < 0.005$). *App^{l^d/+};MBSw/APPL* flies not fed with RU exhibit scores similar to *App^{l^d/+};+/APPL* flies fed with RU (Newman–Keuls post-hoc, $p > 0.05$). **C**, The MBSw driver leads to an increase in *Appl* levels in the absence of RU-induction. Total RNA was extracted from *App^{l^d/+};+/APPL* and *App^{l^d/+};MBSw/APPL* fly heads, respectively, and further reversed transcribed. Resulting cDNA was quantified by qPCR using *Tub* expression as a reference (t test, *** $p < 0.001$, $n = 2$). Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index.

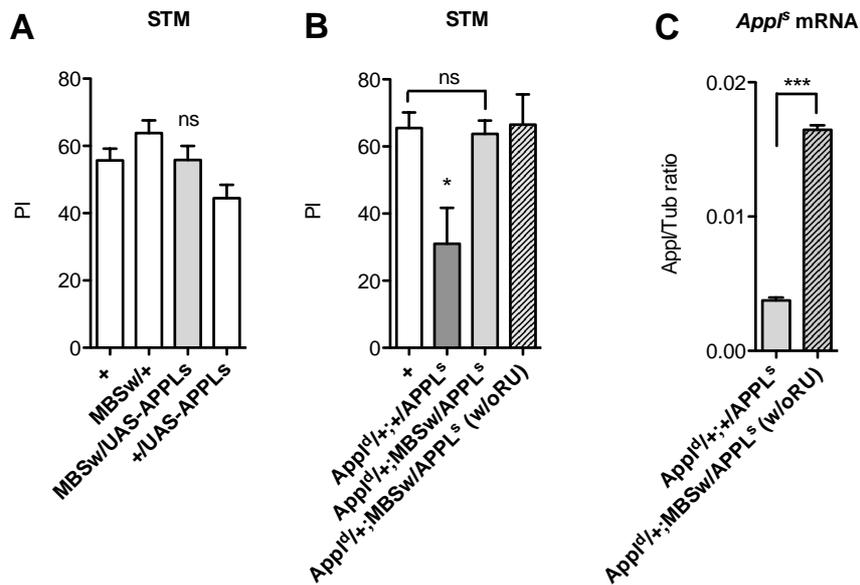


Figure 3. Expression of secreted APPL rescues the memory deficit caused by APPL partial loss-of-function. Unless indicated (**B**, **C**, w/o RU), flies were fed with RU for 48 h. **A**, **B**, Flies were submitted to one cycle training and memory was tested 2 h later. *MBSw/APPL^s* flies exhibit STM performances similar to control groups ($F_{(3,87)} = 4.63$, $**p < 0.005$, $n \geq 18$, Newman–Keuls post-hoc *MBSw/APPL^s* vs *MBSw/+* $p > 0.05$ and *MBSw/APPL^s* vs *+ /APPL^s* $p > 0.05$). **B**, Rescue experiments. *Appl^d/+;MBSw/APPL^s* flies display a score significantly higher than that of *Appl^d/+;+/APPL^s* flies ($F_{(3,42)} = 5.72$, $**p < 0.005$, $n \geq 6$, Newman–Keuls post-hoc $**p < 0.005$), and similar to wild-type (+) control flies (Newman–Keuls post-hoc, $p > 0.05$). *Appl^d/+;MBSw/APPL^s* flies not fed with RU exhibit scores similar to *Appl^d/+;+/APPL^s* flies fed with RU (Newman–Keuls post-hoc, $p > 0.05$). **C**, APPL^s is expressed in the absence of RU feeding. Total RNA was extracted from *Appl^d/+;+/APPL^s* and *Appl^d/+;MBSw/APPL^s* fly heads and further reversed transcribed. cDNA resulting specifically from the APPL^s construct was quantified by qPCR using Tub expression as a reference (t test, $***p < 0.001$, $n = 2$). Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index.

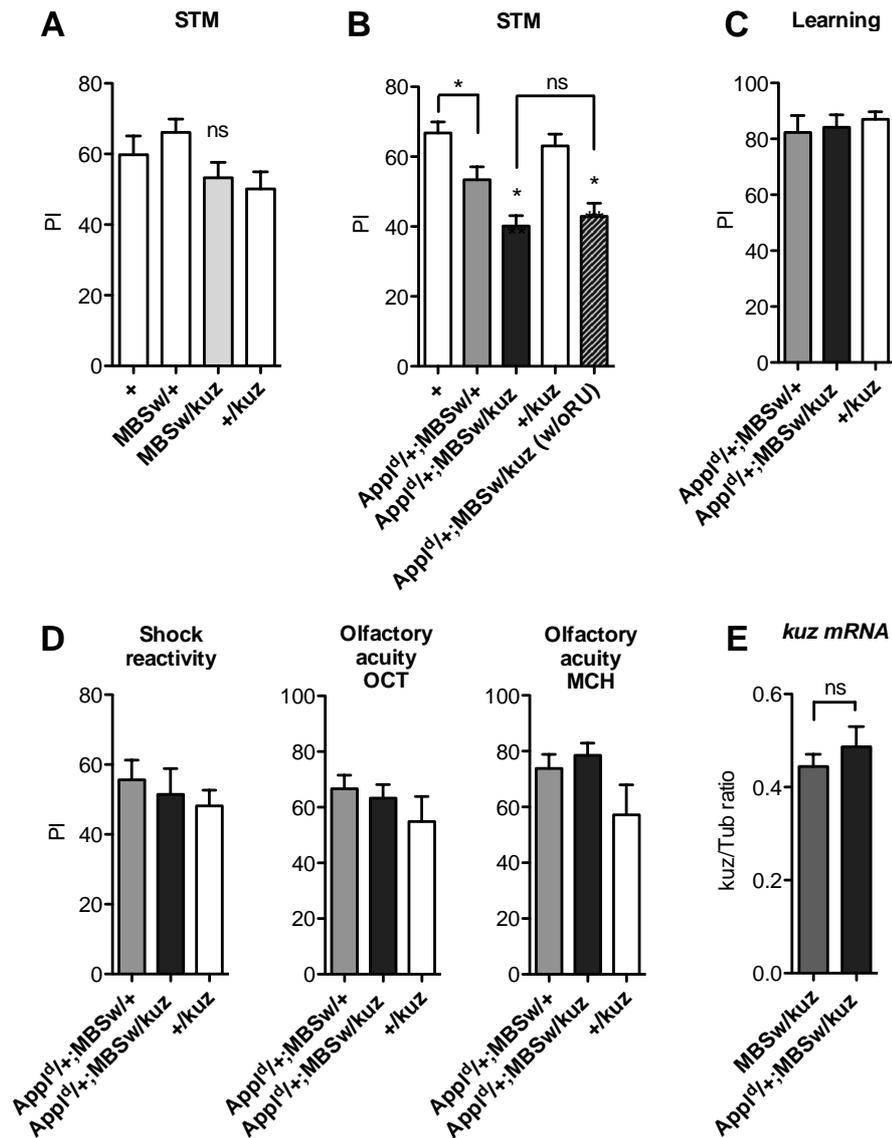


Figure 4. KUZ overexpression exacerbates the memory deficit caused by APPL partial loss-of-function. Unless indicated (**B**, w/o RU), flies were fed with RU for 48 h before conditioning or total RNA extraction to induce the expression of the UAS-*kuz* transgene. **A**, **B**, Flies were submitted to one cycle training and tested 2 h later. **A**, KUZ overexpression in wild-type flies does not impact STM. The score of *MBSw/kuz* flies is not different from that of the genetic control groups ($F_{(3,85)} = 2.41$, $p = 0.0731$, $n \geq 21$). **B**, KUZ overexpression in APPL partial loss-of-function flies exacerbates their STM deficit. Heterozygous *App^l/+;MBSw/+* flies exhibit a STM score significantly lower than the wild-type (+) control ($F_{(4,135)}$, $***p < 0.0001$, $n \geq 25$, Newman-Keuls post-hoc, $*p < 0.05$). *App^l/+;MBSw/kuz* flies perform significantly worse than both genetic controls (Newman-Keuls post-hoc, $*p < 0.05$). *App^l/+;MBSw/kuz* flies not fed with RU display scores significantly different from control groups (Newman-Keuls post-hoc, $*p < 0.05$) and similar to *App^l/+;MBSw/kuz* flies fed with RU (Newman-Keuls post-hoc, $p > 0.05$). **C**, Learning is not affected. Learning was assessed by testing flies immediately after one cycle training. *App^l/+;MBSw/kuz* flies exhibit scores

indistinguishable from controls ($F_{(2,21)} = 0.25$, $p = 0.7801$, $n \geq 7$). **D**, Neither shock reactivity ($F_{(2,42)} = 0.34$, $p = 0.7113$, $n \geq 13$) nor olfactory acuity (octanol, $F_{(2,40)} = 0.90$, $p = 0.4153$, $n \geq 9$; methylcyclohexanol, $F_{(2,42)} = 2.69$, $p = 0.0798$, $n \geq 9$) is impaired in *App^l^{d/+};MBSw/kuz* flies. **E**, Quantitative PCR analysis of *kuz* expression. Total RNA was extracted from *MBSw/kuz* and *App^l^{d/+};MBSw/kuz* fly heads, respectively. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results shown are ratios to the reference. *kuz* mRNA level is similar in *MBSw/kuz* and *App^l^{d/+};MBSw/kuz* flies (t test, $p = 0.0506$, $n = 3$). Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index. ns, not significant, OCT octanol, MCH, methylcyclohexanol.

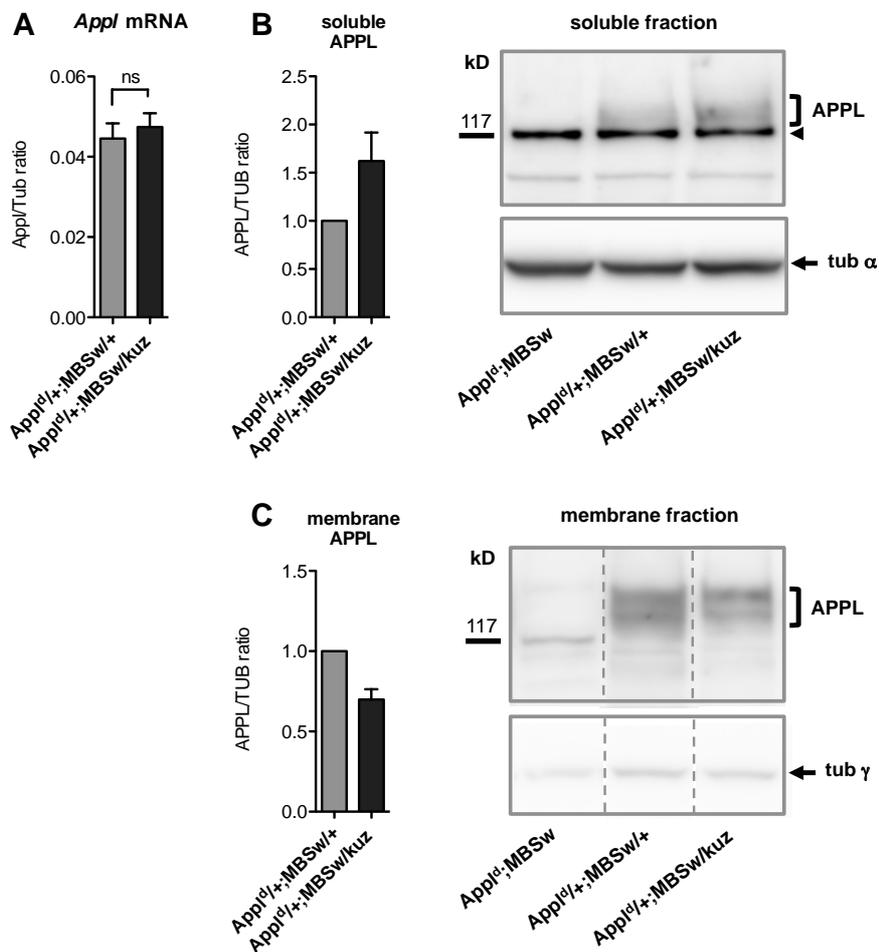


Figure 5. Impact of KUZ overexpression on *Appl* transcription and APPL processing. Flies were fed with RU for 48 h prior to RNA or protein extraction. **A**, Quantitative PCR analyses. Total RNA was extracted from *App^l^{d/+};MBSw/+* and *App^l^{d/+};MBSw/kuz* heads, and resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results shown are ratios to the reference. *Appl* mRNA level is similar in *App^l^{d/+};MBSw/+* and *App^l^{d/+};MBSw/kuz* flies (t test, $p = 0.5814$, $n = 3$). **B**, **C**, Western blot analyses. Protein extracted from fly head lysates was fractionated and resulting blots were stained using a N-ter APPL specific antibody. Left panels, Western Blots. Right panels, quantification. Soluble ($n =$

4) and membrane ($n = 3$) species are expressed as ratios to tub α and tub γ , respectively, relative to the *Appl*^{d/+};*MBSw*/+ control. **B**, Analyses of soluble fractions. Secreted APPL level is increased in *Appl*^{d/+};*MBSw*/*kuz* flies compared to *Appl*^{d/+};*MBSw*/+, while it is not detected in *Appl*^d;*MBSw* null flies. Arrowhead indicates a non-specific cross-reaction. **C**, Analyses of membrane fractions. Left panel, dots lines separate lanes that were not side-to-side. fl-APPL level is decreased in *Appl*^{d/+};*MBSw*/*kuz* flies compared to *Appl*^{d/+};*MBSw*/+ control flies. Bars, Mean \pm SEM.

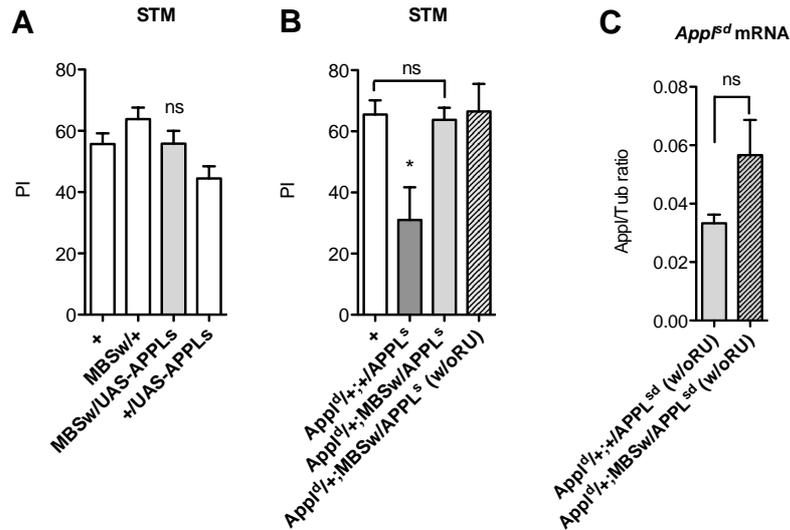


Figure 6. Transient expression of membrane-anchored APPL^{sd} rescues the memory deficit caused by APPL partial loss-of-function. Unless indicated (**B**, w/o RU), flies were fed with RU for 48 h prior to conditioning. Flies were submitted to one cycle training and tested 2 h later. **A**, *MBSw/APPL*^{sd} flies exhibit STM performances similar to control groups ($F_{(3,39)} = 1.69$, $p = 0.1858$, $n \geq 7$). **B**, *Appl*^{d/+};*MBSw/APPL*^{sd} flies display a memory score significantly higher than that of *Appl*^{d/+};/+/*APPL*^{sd} flies ($F_{(3,47)} = 6.85$, $***p < 0.001$, $n \geq 9$, Newman–Keuls post-hoc $**p < 0.005$), and similar to wild-type (+) control flies (Newman–Keuls post-hoc, $p > 0.05$). *Appl*^{d/+};*MBSw/APPL*^{sd} flies not fed with RU exhibit scores indistinguishable from that of *Appl*^{d/+};/+/*APPL*^{sd} flies (Newman–Keuls post-hoc, $p > 0.05$), and significantly lower than wild-type (+) (Newman–Keuls post-hoc, $*p < 0.05$). *Appl*^{d/+};*MBSw/APPL*^{sd} flies not fed with RU exhibit a STM score significantly decreased compared to the flies of the same genotype fed with RU (Newman–Keuls post-hoc, $**p < 0.005$). **C**, Quantitative PCR analysis of APPL^{sd} expression. Total RNA was extracted from *Appl*^{d/+};/+/*APPL*^{sd} and *Appl*^{d/+};*MBSw/APPL*^{sd} fly heads, respectively. Resulting cDNA was quantified using two distinct sets of APPL primers, and tubulin (Tub) expression as a reference. APPL primers 1 are specific of the wild-type APPL cDNA, while APPL primers 2 amplify both APPL and APPL^{sd}. Results shown are ratios to the reference. *Appl* as well as *Appl* + *Appl*^{sd} mRNA levels are similar in *Appl*^{d/+};/+/*APPL*^{sd} and *Appl*^{d/+};*MBSw/APPL*^{sd} fly heads (t test, $p = 0.1080$, $n = 2$). Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index.

Résultats additionnels

Dans cette section sont présentés quelques résultats additionnels issus d'expériences entreprises en parallèle des travaux présentés dans l'article 1.

Utilisation du système inductible TARGET pour inhiber l'expression d'Appl. Dans l'article 1, nous montrons que l'expression de l'ARNi-*Appl* 108312 dans les CPs de mouches adultes sous contrôle du pilote d'expression MBSw induit un défaut de STM. En parallèle, nous avons induit l'expression de ce même ARNi-*Appl* 108312 sous le contrôle d'un autre pilote d'expression inductible : *tubGAL80^{ts}; 238Y*. Après 3 j d'induction à 30,5°C, les mouches *tubGAL80^{ts}; 238Y/ARNi-*Appl* 108123* présentent un défaut de STM (Figure 20). Leurs performances de mémoire, testées 2 h après 1 cycle de conditionnement, sont significativement diminuées par rapport à celles de leurs contrôles génétiques ($F_{(2,45)}$, $**p < 0.005$, $n \geq 15$). Après 3 j à 18°C, le défaut de STM n'est pas observé ($F_{(2,34)}$, $p = 0.6531$, $n = 12$), ce qui démontre que ce défaut est dépendant de l'expression de l'ARNi. Les capacités d'apprentissage de mouches *tubGAL80^{ts}; 238Y/ARNi-*Appl* 108312* évaluées par un test réalisé immédiatement après 1 cycle de conditionnement ne sont pas affectées ($F_{(2,23)}$, $p = 0.4456$, $n \geq 8$). Ces résultats confirment qu'une forte inhibition d'APPL restreinte aux CPs chez des drosophiles adultes affecte la mémoire à 2 h sans altérer la mémoire immédiate.

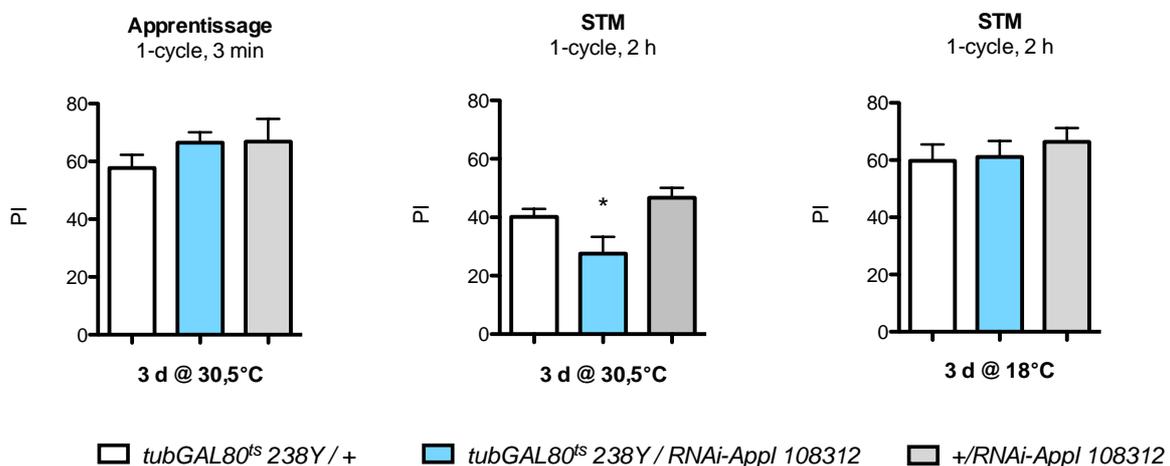


Figure 20. L'expression de l'ARNi-*Appl* 108321 sous contrôle du promoteur inductible *tubGAL80^{ts}; 238Y* affecte la STM.

Les histogrammes représentent la moyenne des index de performance \pm SEM. Les astérisques correspondent à la moins significative des comparaisons post-hoc. PI, Performance index

Le système inductible GeneSwitch repose sur un activateur de transcription dépendant de l'ajout de son ligand dans le milieu nutritif des mouches. Nous avons à plusieurs reprises

observé que la faible expression du transgène en absence d'induction du ligand pouvait être suffisante pour induire un phénotype de mémoire (pour exemple, voir Figure 2B-C de l'article 1). Le système TARGET dépend lui de la présence d'un inhibiteur de l'activateur de transcription qui est thermosensible. Ce système semble être plus « verrouillé » par la présence constante de cet inhibiteur, et sera désormais utilisé de manière systématique dans la poursuite du projet au laboratoire.

Inhibition de l'activité α -sécrétase dans les CPs adultes. Lorsque nous avons observé que la forme sécrétée d'APPL permettait de sauver le déficit de mémoire causé par une perte de fonction partielle d'APPL, nous avons entrepris de mesurer l'effet de l'inhibition de l'activité α -sécrétase dans les CPs de mouches adultes sur la mémoire, afin de diminuer la production de sAPPL α . Pour cela, nous avons induit l'expression d'un ARNi-*kuz* (VDRC, transformant 107036) sous contrôle du pilote d'expression *MBSw* dans un contexte sauvage et dans un contexte de perte-de-fonction partielle d'APPL (Figure 21).

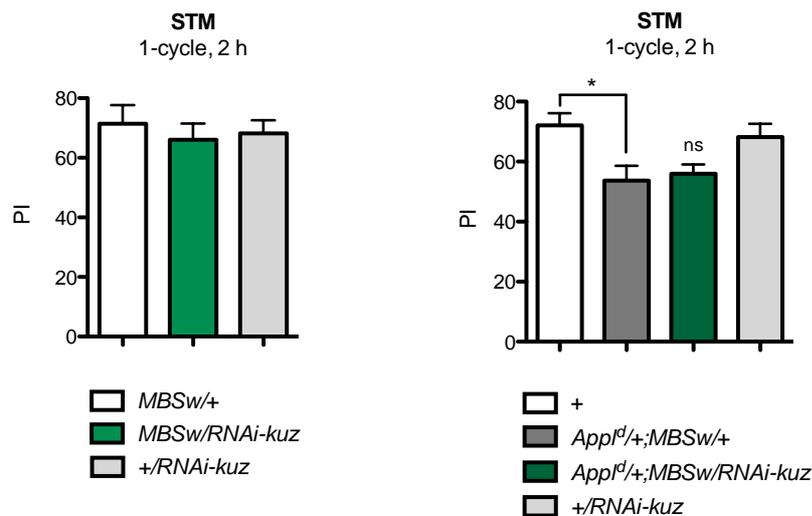


Figure 21. L'inhibition de *kuzbanian* dans les CPs adultes n'affecte pas la STM.

Les histogrammes représentent la moyenne des index de performance \pm SEM. Les astérisques correspondent à la moins significative des comparaisons post-hoc. PI, Performance index

Les performances testées 2 h après 1 cycle de conditionnement des mouches *MBSw/ARNi-kuz* ne sont pas différentes de celles de leurs contrôles génétiques ($F_{(2,39)}$, $p = 0.7933$, $n \geq 12$). Comme observé auparavant, les hétérozygotes *AppI^d/+;MBSw/+* présentent un défaut de mémoire à 2 h comparé aux mouches sauvages ($F_{(3,59)}$, $**p < 0.005$, $n \geq 14$, Newman-Keuls post-hoc $*p < 0.05$). Les performances des mouches *AppI^d/+;MBSw/ARNi-*

kuz ne sont pas différentes de celles des hétérozygotes *App1^{d/+};MBSw/+* (Newman–Keuls post-hoc $p > 0.05$). Ainsi, inhiber l'expression de *kuz* dans les CPs adultes n'affecte pas la mémoire à 2 h, quelque soit le niveau d'APPL endogène. Ce résultat montre qu'inhiber chez l'adulte la protéolyse d'APPL par l' α -sécrétase, ou celle de ses autres substrats, n'a pas d'incidence sur la STM. Inhiber l'activité de l' α -sécrétase devrait permettre de diminuer les formes APPL secrétées, mais aussi peut-être d'augmenter les formes complètes d'APPL membranaire. Une telle action serait donc sans incidence sur la STM de mouches sauvages d'une part, et avec un niveau d'APPL réduit d'autre part. Nous avons démontré dans l'article 1 que l'expression en large excès d'une forme constitutivement ancrée à la membrane permet de sauver le déficit de STM induit par l'inhibition d'APPL. Ici, si la quantité d'APPL membranaire est augmentée aux dépens des formes secrétées et que cela ne permet pas de restaurer la STM, cette observation conforterait l'hypothèse selon laquelle les deux formes sont requises conjointement pour la mémoire.

Résultats complémentaires : tous les mutants APPL non-protéolysables sauve le déficit de STM induit par la perte partielle d'APPL

Dans la continuité de l'étude présentée dans l'article 1, nous avons voulu identifier quel domaine protéique de la forme complète d'APPL est requis pour la mise en place de la STM. Pour cela, nous avons utilisé plusieurs formes mutantes d'APPL^{sd} (Torroja et al., 1999) qui portent chacune, en plus de la déletion du région contenant les sites de clivages α et β , une délétion supplémentaire correspondant à l'un des domaines protéiques dont la fonction est connue (Figure 22). Nous avons mis en place la même stratégie que celle décrite dans l'article, à savoir, tenter de restaurer le défaut de mémoire de mouches hétérozygotes pour *App1^{d/+};MBSw/+* en exprimant dans les CPs chez l'adulte les séquences de ces APPL mutants (Figure 23).

Les cinq mutants dérivés d'APPL^{sd} dont nous disposons sont les suivants : APPL^{sd Δ E1}, APPL^{sd Δ E2}, APPL^{sd Δ C}, APPL^{sd Δ Cg} et APPL^{sd Δ NPTY}. Les deux premiers sont exempts d'une partie du domaine extracellulaire, soit le domaine E1 (Δ E1), soit le domaine E2 (Δ E2) qui sont tous deux impliqués dans l'adhésion cellulaire et la dimérisation. Les trois suivants sont dépourvus soit du domaine intracellulaire complet (Δ C), soit de séquences spécifiques au sein de ce domaine : le site de liaison aux G protéines (Δ Cg) ou le motif d'internalisation (Δ NPTY).

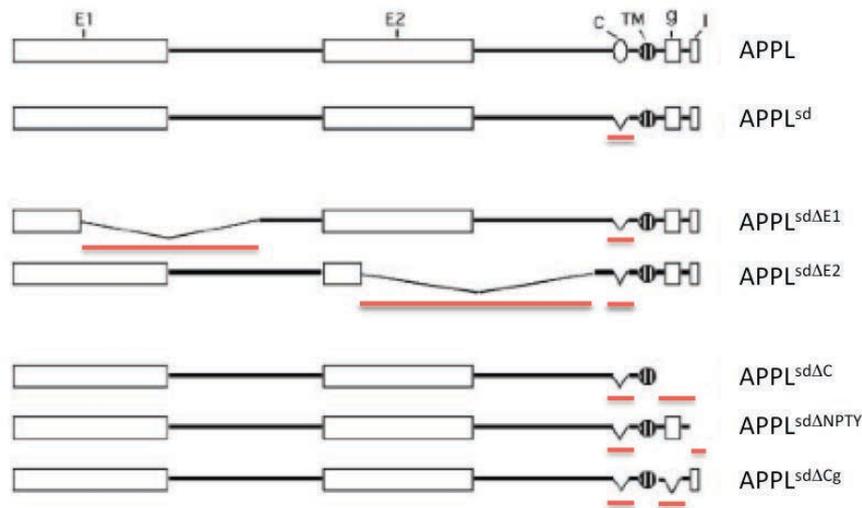


Figure 22. Les différents mutants APPL^{sd}.

Plusieurs mutants générés à partir de la séquence APPL^{sd} portent des déléutions de domaines spécifiques. Les déléutions sont soulignées en rouge. C, région des sites de clivages α et β ; TM, domaine transmembranaire ; g, site de liaison aux protéines G ; I, motif d'internalisation (NPTY) (Torroja et al., 1999a).

Dans chacune des expériences, les mouches hétérozygotes pour *App1^d* (*App1^d/+ ; +/APPL^X*) présentent comme attendu des performances de mémoire à 2 h diminuées par rapport à celles des drosophiles sauvages + (voir Tableau 1, ligne 1 ; APPL^{sdΔE1}, $F_{(3,42)}$, $**p < 0.005$, $n \geq 8$; APPL^{sdΔE2}, $F_{(3,53)}$, $**p < 0.005$, $n \geq 12$; APPL^{sdΔC}, $F_{(3,95)}$, $***p < 0.0001$, $n \geq 14$; APPL^{sdΔCg}, $F_{(3,48)}$, $***p < 0.0001$, $n \geq 11$; APPL^{sdΔNPTY}, $F_{(3,63)}$, $**p < 0.005$, $n \geq 15$). L'expression de chacun des mutants APPL^{sd} dans les CPs permet de compenser le défaut de STM causé par la perte partielle d'APPL. Les performances mnésiques testées 2 h après 1 cycle de conditionnement des mouches exprimant les séquences mutantes sont similaires à celles de mouches sauvages (voir Tableau 1, ligne 2) et significativement plus élevées que celles des hétérozygotes *App1^d/+ ; +/APPL^X* (voir Tableau 1, ligne 3). La portée de ces résultats sera commentée dans la discussion générale.

Dans le cas des mutants APPL^{sdΔE1} et APPL^{sdΔE2}, le sauvetage fonctionnel n'est pas dépendant de l'induction du transgène, ce qui ne permet pas d'éliminer un effet de ces formes lors du développement. Les performances des mouches *App1^d/+ ; MBSw/APPL^{sdΔC}* chez qui le transgène n'a pas été induit ne sont pas différentes des mouches de même génotype chez qui il l'a été mais pas non plus différentes des simples hétérozygotes, ce qui ne permet pas à l'heure actuelle de conclure sur un effet spécifique chez l'adulte.

Les sauvetages induits par les formes APPL^{sdΔCg} et APPL^{sdΔNPTY} sont en revanche dépendant de l'induction du transgène, ce qui permet d'affirmer que le défaut de STM induit par la perte partielle d'APPL peut être compenser de façon restreinte chez l'adulte (voir Tableau 1, lignes 5 et 6).

Néanmoins, les travaux de Soldano et al. (2013) ayant montré que des hétérozygotes *AppI^d/+* ne présentent pas de défaut de développement des CPs, et à partir du moment où certaines expériences ont permis de conclure que le défaut de STM de ces hétérozygotes est un défaut fonctionnel chez l'adulte, il est très vraisemblable que les phénotypes observés soient tous le résultat d'un sauvetage fonctionnel chez l'adulte.

Newman-Keuls post-hoc	APPL ^{sdΔE1}	APPL ^{sdΔE2}	APPL ^{sdΔC}	APPL ^{sdΔCg}	APPL ^{sdΔNPTY}
+ vs <i>AppI^d/+ ; +/APPL^X</i>	*	*	***	*	*
+ vs <i>AppI^d/+ ; MBSw/APPL^X</i>	ns	ns	ns	ns	ns
<i>AppI^d/+ ; +/APPL^X</i> vs <i>AppI^d/+ ; MBSw/APPL^X</i>	**	*	*	**	*
+ vs <i>AppI^d/+ ; MBSw/APPL^X (w/oRU)</i>	ns	ns	ns	ns	**
<i>AppI^d/+ ; +/APPL^X</i> vs <i>AppI^d/+ ; MBSw/APPL^X (w/oRU)</i>	*	*	ns	ns	ns
<i>AppI^d/+ ; MBSw/APPL^X</i> vs <i>AppI^d/+ ; MBSw/APPL^X (w/oRU)</i>	ns	ns	ns	*	*

Tableau 1. Comparaisons statistiques deux-à-deux par le test de Newman-Keuls suite à une ANOVA une voie.

APPL^X représente le mutant APPL^{sd} de la colonne correspondante. Les astérisques indiquées suivent à la nomenclature habituelle. ns indique que la p-value est supérieure à 0,05.

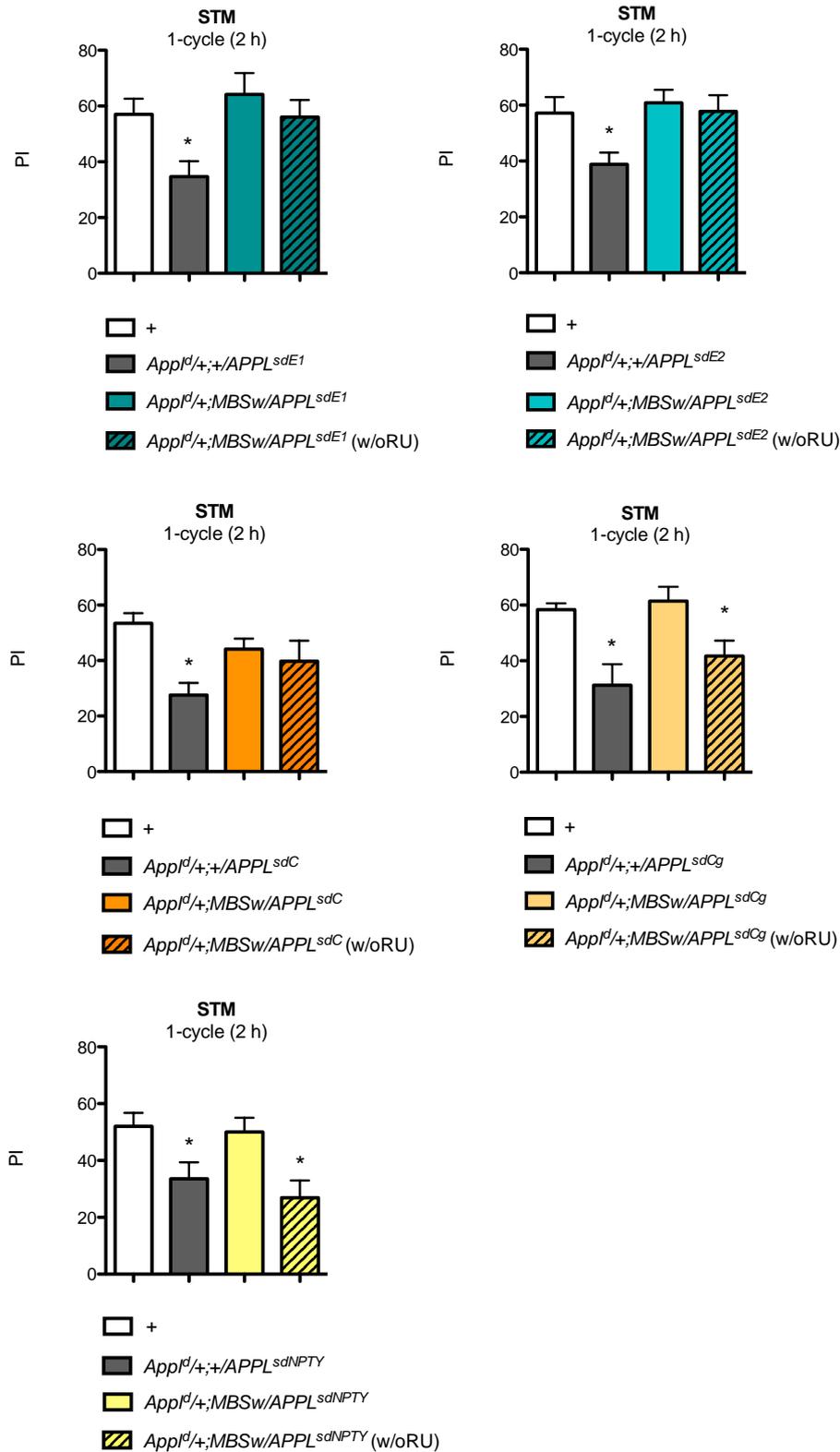


Figure 23. L'expression de tous les mutants APPL^{sd} permet de compenser le déficit de STM lié à la perte partielle d'APPL.

Les histogrammes représentent la moyenne des index de performance \pm SEM. Les astérisques correspondent à la moins significative des comparaisons post-hoc. PI, Performance index.

Partie 2. Rôle de la voie amyloïdogénique dans la mémoire olfactive chez la drosophile adulte

Une seconde partie de ma thèse a été consacrée à l'analyse fonctionnelle de la voie amyloïdogénique chez l'adulte : nous avons étudié l'incidence sur la mémoire de l'augmentation transitoire de l'activité β -sécrétase ou celle de la synthèse du peptide A β . Nous avons démontré que ni la surexpression de la β -sécrétase ni celle de dA β n'a d'incidence en soi sur la mémoire à 2 h chez le jeune adulte, mais qu'en revanche, elles exacerbent le déficit de mémoire lié à la perte partielle d'APPL. Nos travaux suggèrent qu'A β pourrait agir comme un aggravateur d'une perte de fonction APPL préexistante. Ces travaux font l'objet d'un article prochainement soumis à publication et qui constitue la première partie de ce chapitre. Dans une seconde section, seront présentés des résultats additionnels obtenus en analysant la β -sécrétase humaine.

« Le peptide amyloïde exacerbe le déficit de mémoire causé par l'inhibition d'APPL chez la drosophile adulte »

Introduction

La toxicité du peptide A β est au centre de la MA, néanmoins les mécanismes moléculaires par lesquels il pourrait altérer les processus mnésiques restent inconnus. A des concentrations physiologiques, un rôle bénéfique pour la transmission synaptique soutenant la mémoire lui a été attribué (Morley and Farr, 2014), ainsi il semble important de comprendre comment sa présence en excès devient pathologique. A notre connaissance, aucune étude à ce jour ne s'est portée sur l'étude d'une surproduction d'A β restreinte chez le jeune adulte : toutes les analyses reposent sur des modèles constitutifs. Il nous a paru important de mener une étude fonctionnelle de la voie amyloïdogénique en la favorisant de manière transitoire. Nous avons tiré avantage des outils génétiques disponibles chez la drosophile pour limiter la production de dA β dans les CPs de mouches adultes. La drosophile possède un homologue à la β -sécrétase, dBACE, qui coexprimée avec APPL, est à l'origine de la formation de dépôts composés de dA β (Carmine-Simmen et al., 2009). Les drosophiles invalidées pour dBACE meurent durant le développement (Bolkan et al., 2012). Dans le cerveau adulte, l'expression de dBACE est faible.

Résultats principaux

Nous avons utilisé le système GeneSwitch pour contrôler l'expression de dBACE. La surexpression de dBACE dans les CPs de mouches adultes n'altère ni les performances de STM, ni celles de LTM. Nous avons ensuite effectué la même analyse dans un contexte génétique limité en APPL. La surexpression de dBACE chez les mouches *App1^{d/+};MBS^{w/+}* aggrave le déficit de mémoire à 2 h lié à la perte partielle d'APPL. Dans la mesure où nous ne pouvions attester biochimiquement de la formation de dA β après surexpression de dBACE, nous avons recherché un corrélat comportemental en surexprimant directement une séquence codant dA β . Surexprimer dA β transitoirement dans les CPs du jeune adulte n'a pas d'incidence sur la mémoire à 2 h, indiquant que la synthèse d'une grande quantité de peptides amyloïde dans un cerveau sain n'affecte pas la STM. En revanche, dans un contexte de perte de fonction partielle d'APPL, tout comme dBACE, l'expression de dA β dans les CPs aggrave le déficit de mémoire, suggérant qu'il existe une interaction fonctionnelle négative entre APPL et dA β pour la mise en place de la mémoire.

Article 2

Title: Amyloid- β peptide exacerbates the memory deficit due to Amyloid Precursor Protein loss-of-function in young flies

Authors: Isabelle Bourdet, Aurélie Lampin-Saint-Amaux, Thomas Preat*, Valérie Goguel*

Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France.

*Corresponding authors

Valérie Goguel, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: valerie.goguel@espci.fr

Thomas Preat, Genes and Dynamics of Memory Systems, Brain Plasticity Unit, CNRS, ESPCI-ParisTech, PSL Research University, 10 rue Vauquelin, 75005 Paris, France. E-mail: thomas.preat@espci.fr

Short title: A β alters memory when associated to APPL LOF

Key words: APP; APPL; BACE; β -secretase; Amyloid peptide; *Drosophila*; Short-term memory; Mushroom body

Abstract

The amyloid precursor protein (APP) plays a central role in Alzheimer's disease (AD). APP can undergo two exclusive proteolytic pathways: cleavage by the α -secretase initiates the non-amyloidogenic pathway while cleavage by the β -secretase initiates the amyloidogenic pathway that leads, after a second cleavage by the γ -secretase, to amyloid- β (A β) peptides that can form toxic extracellular deposits, a hallmark of AD. Importantly, aside from A β toxicity whose molecular mechanisms remain elusive, several studies have suggested that APP plays a positive role in memory, raising the possibility that APP loss-of-function may participate to AD. We showed recently that APPL, the *Drosophila* APP ortholog, is required for associative memory in young flies. In the present report, we provide the first analysis of the amyloidogenic pathway's influence on memory in the adult. We show that transient overexpression of the β -secretase in the mushroom bodies, the adult center for olfactory memory, does not alter memory. In sharp contrast, β -secretase overexpression affected memory when associated with APPL partial loss-of-function. Interestingly, similar results were observed with A β peptides. Because A β overexpression impaired memory only when combined to APPL partial loss-of-function, the data strongly suggest that A β affects memory through the APPL pathway. Thus, memory is altered by two connected mechanisms: APPL loss-of-function and amyloid peptide toxicity; revealing for the first time in *Drosophila* a functional interaction between APPL and amyloid peptides.

Introduction

The Amyloid Precursor Protein (APP) is a major actor of Alzheimer's disease (AD), a progressive neurodegenerative disorder which first symptom is the loss of episodic memory (Förstl and Kurz, 1999). APP is a transmembrane protein that can be cleaved by membrane-associated proteases following two exclusive pathways: on the one hand, cleavage by the α -secretase initiates the non-amyloidogenic pathway that generates a large secreted fragment sAPP α ; on the other hand, the amyloidogenic pathway is initiated by the β -secretase cleavage that liberates sAPP β and, after a second cleavage by γ -secretase, extracellular A β peptides (Turner et al., 2003). Aggregation of A β peptides forms extracellular amyloid plaques, a major histopathological hallmark of AD.

Beta-site APP Cleaving Enzyme-1 (BACE1) is the major neuronal β -secretase in the human brain (Cole and Vassar, 2007). Although genetic analyses have failed to uncover any BACE1 mutation in patients with familial hereditary AD (FAD), increased β -secretase activity has been reported in FAD (Citron et al., 1992), and increased expression has been found in cortex of sporadic AD patients (Fukumoto et al., 2002; Holsinger et al., 2002; Yang et al., 2003; Li et al., 2004a). Thus, elevated BACE1 cerebrospinal fluid levels have been proposed as an early biomarker for AD pathology. In transgenic mice AD models that express human APP, loss of BACE1 prevents A β production and APP-induced phenotypes (Cai et al., 2001; Luo et al., 2001; Roberds et al., 2001; Laird et al., 2005; Ohno et al., 2007). Due to its rate limiting function in A β production (Dislich and Lichtenthaler, 2012), BACE1 has been a prime therapeutic target to prevent A β generation in AD (Vassar, 2001). However, none of the numerous inhibitors developed that successfully decrease A β release helped preventing the cognitive decline (Ghosh et al., 2012). Furthermore, there are discrepancies in correlating A β deposition in patient brains with AD dementia symptoms, notably the presence of senile

plaques in healthy elderly and the weak correlation between plaques localization and neuronal death in AD patients (Braak and Braak, 1991; Carter and Lippa, 2001; Knopman et al., 2003).

Functional studies of the APP pathway in rodents are limited because of redundancy due to three APP-related genes and the lethality of the triple knockout (Heber et al., 2000; Herms et al., 2004). Moreover, AD mouse studies rely mainly on the use of constitutive mutants, so that developmental functions cannot be easily discriminated from direct roles in the adult brain. In contrast, *Drosophila melanogaster* genome encodes a single non essential APP ortholog named APP-Like (APPL) (Luo et al., 1990), and in this organism, expression of genes of interest can be controlled both spatially and temporally (Keene and Waddell, 2007). Although relatively simple (100,000 neurons) (Shimada et al., 2005), the *Drosophila* brain is highly organized and is able to drive various sophisticated behaviors. The mushroom bodies (MB), a prominent bilateral structure of the insect brain comprising 2,000 neurons per brain hemisphere (Aso et al., 2009), constitute the olfactory learning and memory center (Heisenberg, 1998). Depending on the sequence of an aversive associative training protocol, distinct types of olfactory memory can be formed (Tully et al., 1994), and remarkably, molecular processes at play are conserved from flies to mammals (McGuire et al., 2005).

APPL is enriched in the adult MB (Torroja et al., 1996). Importantly, α - β - and γ -secretases have been characterized in *Drosophila*, and APPL has been shown to undergo proteolytic pathways similar to that of APP (Poeck et al., 2012). Although human APP and *Drosophila* APPL show no sequence similarity at the level of the A β sequences, an A β -like peptide (dA β) generated after a β -secretase initial cleavage of APPL has been recently characterized in the fly (Carmine-Simmen et al., 2009). Like its human counterpart, dA β peptides form ThioflavineS-positive aggregates upon aging that are associated with neurodegeneration, suggesting that dA β is a functional analog of human A β (Carmine-Simmen et al., 2009).

Transgenic flies have been generated to study human A β -induced toxicity (Iijima and Iijima-Ando, 2008). Neuronal expression of secreted human A β 42 results in many of the features observed in the mouse model, and moreover, the severity of the neurodegenerative phenotypes correlates with the amyloidogenic properties of the A β peptides (Finelli et al., 2004; Greeve et al., 2004; Iijima et al., 2004; Crowther et al., 2005; Iijima et al., 2008; Zhao et al., 2010). Thus similarities between neurotoxic biochemical pathways induced by A β deposition in flies and humans indicate that *Drosophila* constitutes a relevant model to study the molecular basis of AD pathogenesis.

Several studies in rodents have suggested that APP plays a positive role in memory (Bour et al., 2004; Ring et al., 2007; Taylor et al., 2008). Similarly, we showed recently in *Drosophila* that APPL is required for memory in young adults (Goguel et al., 2011), supporting the hypothesis that APP loss-of-function may contribute to AD initial symptoms. Here we provide the first analysis of the influence of the amyloidogenic pathway on memory in adults. We investigated the effect on olfactory memory of the transient overexpression of the *Drosophila* β -secretase, dBACE (Carmine-Simmen et al., 2009). Strikingly, dBACE overexpression in the MB of young flies led to a memory defect only when associated to APPL partial loss-of-function. Furthermore, similar data were obtained when dA β was overexpressed in the MB. The results thus suggest that memory is affected by two connected mechanisms: amyloid peptide toxicity and APPL loss-of-function.

Materials and Methods

Drosophila stocks. All fly strains were outcrossed to a Canton Special genetic background. *UAS-dBACE* (*dBACE*) and *UAS-dA β* (*dA β*) lines were kindly provided by D. Kretzschmar (Carmine-Simmen et al., 2009). The *App^{l^d};MBS^w* line is described in Bourdet et al. (submitted). For behavioral and quantitative PCR experiments, flies were raised on

standard medium with 60% humidity under a 12 h light/dark cycle at 18°C and 25°C, respectively. As the *Appl* gene is located on the X chromosome, only females were analyzed for experiments that involved *Appl^d* genotypes. To induce transgene expression, the GeneSwitch system was used as described by Mao et al. (2004). A stock solution of RU486 (SPI-Bio) (10 mM in 80% ethanol) was mixed into molten food at 65°C to a final concentration of 200 µM.

Behavior experiments. Flies were trained with classical olfactory aversive conditioning protocols as described by Pascual and Pr at (2001). 1-2 day old flies were kept on RU486-containing medium (RU) for 48 h prior to conditioning. Training and testing were performed at 25°C with 80% humidity. Conditioning was performed on samples of 30-40 flies with 3-octanol (>95% purity; Fluka 74878, Sigma-Aldrich) and 4-methylcyclohexanol (99% purity; Fluka 66360, Sigma-Aldrich) at 0.360 mM and 0.325 mM, respectively. Odors were diluted in paraffin oil (VWR International, Sigma Aldrich). Memory tests were performed with a T-maze apparatus (Tully and Quinn, 1985). Flies could choose for 1 min between two arms, each delivering a distinct odor. An index was calculated as the difference between the numbers of flies in each arm divided by the sum of flies in both arms. A performance index results from the average of two reciprocal experiments with either octanol or methylcyclohexanol as conditioned stimulus. For odor avoidance tests after electric shock exposure, and response to electric shock, flies were treated as described by Pascual and Pr at (2001).

Quantitative PCR analyses. Total RNA was extracted from 50 female heads with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen), submitted to DNase I treatment (Biolabs), and further reverse transcribed with oligo(dT)20 primers using the SuperScript III First-Strand kit (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. We compared the level of the target cDNA to that of the α -Tub84B (CG1913) cDNA, which was used as a reference.

Amplification was performed using a LightCycler 480 (Roche) in conjunction with the SYBR Green I Master (Roche). For each experiment, reactions were carried out in triplicate for two dilutions of each cDNA. The n represents the number of independent experiments performed. To measure specifically mRNA resulting from the *UAS-dA β* transgene, we took advantage of the HA-tag coding sequence that has been inserted in 3' of the dA β sequence (Carmine-Simmen et al., 2009). Specificity and size of amplification products were assessed by melting curve analyses and agarose gel electrophoresis, respectively. Expression relative to the reference is expressed as a ratio ($2^{-\Delta C_p}$, where C_p is crossing point).

Statistical analyses. Memory scores are displayed as mean \pm standard error of the mean (SEM). To compare performance indexes from more than two groups, statistical analyses were performed through a 1-way ANOVA, followed by Newman-Keuls pairwise comparisons. Overall ANOVA p -value is given in the legends along with the value of the corresponding Fisher distribution $F(x,y)$, where x is the number of degrees of freedom for groups and y the total number of degrees of freedom for the distribution, while asterisks on the figure represent the least significant of the pairwise post-hoc comparisons between the genotype of interest and its controls, following the usual nomenclature. To compare memory scores of two groups, Student's t tests were used with $p < 0.05$ as a significance threshold. mRNA quantification measurements were analyzed from $2^{-\Delta C_p}$ ratios in the same way.

Results

It has been suggested that deregulation of BACE1 gene expression could play an important role in AD pathogenesis (Vassar et al., 2009). Nevertheless, the incidence of the β -secretase overactivity in adult animal models has never been addressed. In this study, we aimed to study the effect on memory of β -secretase overexpression in the adult fly. We took advantage of the conditional GeneSwitch system, a genetic tool that allows to control both

spatially (Osterwalder et al., 2001) and temporally the expression of genes of interest: GeneSwitch encodes a Gal4-Switch fusion protein that becomes active when flies are fed with the RU486 ligand (Roman et al., 2001).

Drosophila olfactory memory can be assessed using a classical aversive conditioning paradigm in which flies are successively exposed to two distinct odors, one of which is coupled to pulses of electric shock. Depending on the sequence of the training flies form distinct memory phases (Tully et al., 1994). Learning is assessed immediately after a single cycle of conditioning, whereas short-term memory (STM) is assessed 2 h after. Long-term memory (LTM) forms after spaced conditioning and is the only memory phase that depends on *de novo* protein synthesis (Tully et al., 1994).

We analyzed dBACE overexpression in the adult MB using the MB-Switch driver (MBSw, Mao et al., 2004) and a *UAS-dBACE* transgene (Carmine-Simmen et al., 2009). Flies overexpressing dBACE (*MBSw/dBACE*) exhibited a STM score that was not significantly different from that of *+dBACE* control flies (Figure 1A), showing that STM is not affected by dBACE overexpression. Similarly, dBACE overexpression in the adult MB did not alter LTM formation (Figure 1B). In conclusion, β -secretase overactivity in young flies does affect aversive olfactory memory.

To get a better insight into the potential effect of dBACE overexpression on memory, we aimed to study the effect of dBACE overexpression in flies with a reduced level of its potential target, APPL. In our previous work, we knocked down APPL expression in the adult MB by RNA interference (RNAi) with *UAS-RNAi* transgenes (Goguel et al., 2011). However, we did not wish to overexpress simultaneously dBACE and an *Appl-RNAi* construct because the presence of two UAS-transgenes in the fly genome may lead to a substantial decrease in the Gal4-mediated transcription of each of them. Thus, to avoid a decreased efficiency of *Appl* knock down, we took advantage of the *Appl^d* null mutant (Luo et al., 1992) to generate

an APPL partial loss-of-function (LOF) genetic context. We recently described a *Drosophila* model that endogenously express about half the wild-type level of Appl and the conditional MBSw driver (*Appl^d/+;MBSw/+*, Bourdet et al., submitted). *Appl^d/+;MBSw/+* heterozygous flies exhibit a normal learning while STM is affected (Bourdet et al., 2014). Although the APPL partial LOF thus achieved is not conditional, we showed that the resulting STM deficit is functional as it can be rescued by overexpressing an APPL form exclusively at the adult stage (Bourdet et al., submitted).

To assess the effect of dBACE overexpression in an APPL partial (LOF) genetic background, we analyzed dBACE overexpression in *Appl^d/+;MBSw/+* flies. As previously described, *Appl^d/+;MBSw/+* flies displayed an STM impairment (Figure 2A). Strikingly, *Appl^d/+;MBSw/dBACE* flies overexpressing dBACE exhibited an STM score significantly lower than their genetic controls (Figure 2A). In contrast, when *Appl^d/+;MBSw/dBACE* flies were not fed with RU, they displayed a score 1) significantly higher than that of the same flies fed with RU and 2) similar to that of *Appl^d/+;MBSw/+* control flies (Figure 2A). These data show that the observed memory decrease is RU-specific and thus due to the induction of dBACE overexpression in the adult MB in an APPL LOF context. Interestingly, learning capacity remained unaffected (Figure 2B). We also assessed whether *Appl^d/+;MBSw/dBACE* flies perceived normally the stimuli used for conditioning. Their ability to avoid electric shocks was unaffected, as was their response to each odor after electric shock exposure (Figure 2C). Altogether, the data demonstrate that in an APPL partial LOF context, dBACE overexpression is deleterious for STM. Moreover, since dBACE overexpression does not affect memory capacity of flies with wild-type level of APPL, we can conclude that the memory deficit induced by dBACE overexpression is functionally related to the APPL pathway.

We next verified the level of dBACE overexpression in wild-type and APPL LOF flies. The level of dBACE mRNA was similar in *MBSw/dBACE* and *App^{l^d/+};MBSw/dBACE* fly heads (Figure 3A), indicating that the augmentation of the memory deficit observed when dBACE is overexpressed in an APPL partial LOF is not caused by an increase in the level of dBACE expression. We also analyzed whether the memory deficit induced by dBACE overexpression in *App^{l^d/+};MBSw/dBACE* flies was linked to a modulation of *App^l* level of expression. *App^l* mRNA level was similar in *App^{l^d/+};MBSw/+* and *App^{l^d/+};MBSw/dBACE* flies (Figure 3B), showing that the mechanism by which dBACE exacerbates the memory deficit is not through modulation of *App^l* transcription.

A simple hypothesis to explain that β -secretase overexpression affects memory is that it leads to an increase in A β production. Indeed, it has already been shown in mammals that β -secretase overexpression leads to an increase in amyloid peptides production, thus generating a gain-of-toxicity (Chami and Checler, 2012). However, the lack of efficient antibodies that could specifically recognize endogenous dA β in the MB of *App^{l^d/+};MBSw/dBACE* flies did not allow us to analyze dA β production. To circumvent this issue and get more insight into this question, we analyzed memory in transgenic flies expressing amyloid peptides, a model to mimic a gain-of-toxicity context. For this purpose, we used a construct allowing expression of a putative dA β peptide corresponding to the A β region of APP (Carmine-Simmen et al., 2009). The expression of dA β peptides in adult MB did not affect STM (Figure 4A), while expression in the MB of APPL partial LOF flies (*App^{l^d/+};MBSw/dA β*) resulted in STM scores significantly decreased compared to that of the controls (Figure 4B). In the absence of RU feeding, memory performances of *App^{l^d/+};MBSw/dA β* were different from those of the genetic controls but also significantly better than the flies fed with RU (Figure 4B), showing that the memory decrease is specific of dA β expression. We next analyzed learning and observed that *App^{l^d/+};MBSw/dA β* flies exhibited a wild-type performance (Figure 4C). We

verified that dA β expression did not affect either electric shock reactivity or aversive odors acuity (Figure 4D). Our results show that the overexpression of amyloid peptide leads to a STM deficit only when associated to an APPL partial LOF.

We next verified that the memory deficit observed in *App1^{d/+};MBSw/dA β* was not caused by an increase in dA β expression compared to that of *MBSw/dA β* flies (Figure 4E). We also ruled out a transcriptional effect of dA β expression on *App1* by showing that there was no difference in *App1* mRNA level in *App1^{d/+};MBSw/+* and *App1^{d/+};MBSw/dA β* flies (Figure 4F). In conclusion, both overexpression of the β -secretase and dA β peptides exacerbates the memory deficit observed in an APPL LOF background.

Discussion

Initial mechanisms responsible for the appearance of cognitive impairment in AD are still unclear. Particularly, the potential influence of APP loss-of-function and A β toxicity, respectively and in combination, has been poorly characterized. Here, we used *Drosophila* as a model to study the involvement of the APP pathway in memory. We investigated the incidence on memory of transient overexpression in the MB of either the β -secretase or amyloid peptides. We observed that it is deleterious for short-term memory only when associated to APPL partial loss-of-function, showing a functional interaction between APPL and amyloid peptides in memory formation.

To our knowledge, the effect on memory of β -secretase overexpression alone has never been reported. In the present study, we anticipated that increasing the amyloidogenic pathway by overexpressing the fly β -secretase would have a negative impact on memory. However, although high levels of dBACE overexpression were achieved after two days of induction, both STM and LTM remained unaffected. In contrast, dBACE overexpression driven in the MB of flies expressing APPL at a reduced level was deleterious for memory as it exacerbated

the STM deficit due to APPL partial LOF. In transgenic hAPP-mice, increased expression of human BACE1 has been shown to worsen learning and memory deficits (Rockenstein et al., 2005; Chen et al., 2012). Thus, β -secretase overexpression is deleterious for memory in animal models with either hAPP gain-of-toxicity (mice) or APPL partial loss-of-function (fly).

Because dBACE overexpression impairs memory only in an APPL partial LOF background, the data suggest that this effect is connected to the APPL pathway. Interestingly, learning is preserved, a phenotype reminiscent of that of APPL partial LOF alone (Goguel et al., 2011; Bourdet et al., submitted), giving support to the hypothesis that dBACE's negative influence on memory is connected to the APPL pathway. We verified that dBACE expression did not modulate *Appl* transcription, suggesting that it instead affected memory via APPL processing. In mammalian cell cultures, increased activity of BACE1 elicits profound alterations in APP metabolism: 1) elevated levels of sAPP β , CTF β and A β peptides, reflecting an increase of the amyloidogenic pathway, and 2) decreased levels of sAPP α , indicating a decrease of the non amyloidogenic pathway (Hussain et al., 1999; Sinha et al., 1999; Vassar et al., 1999; Yan et al., 1999). In the fly, although dBACE overexpression alone has not been assessed, its neuronal co-expression with APPL generates CTF β and numerous amyloid deposits (Carmin-Simmen et al., 2009). We thus hypothesized that dBACE overexpression led to amyloid peptide synthesis. To investigate this hypothesis, we sought to analyze directly the effect on memory of amyloid peptide overexpression.

To date, *Drosophila* has been used to model AD with constitutive A β expression: neuronal expression of human A β 42 leads to a STM deficit in young adults (5 days old), a learning deficit in older flies (14-15 days old), and formation of amyloid deposits in 48 days old flies (Iijima et al., 2004, 2008). Similarly, constitutive dA β expression has been shown to generate amyloid aggregates in old adults (30 days old), whereas no gross abnormalities were seen in 2 days old flies (Carmin-Simmen et al., 2009). Thus, the present study is the first one

to address the effect of A β transient expression in the adult. Such expression, restricted to the MB of young adults, is unlikely to generate amyloid extracellular deposits or neurodegeneration. We observe that dA β expression in adult MB neurons does not perturb STM, whereas combined with APPL loss-of-function it is deleterious for memory. This result is similar to that observed when the β -secretase is overexpressed, raising the possibility that they rely on similar mechanisms. Fang et al. (2012) reported that A β 42 depresses excitatory cholinergic synaptic transmission in the fly. Interestingly, cholinergic inputs are known to convey olfactory information by activating nicotinic acetylcholine receptors in Kenyon cells, the main neuronal MB population (Ito et al., 1998). APPL loss-of-function and amyloid peptide expression could decrease the synaptic strength required for consolidation and/or recall of memory traces.

Two hypotheses could account for our results: 1) dA β and APPL loss-of-function may alter memory through distinct mechanisms during STM formation, and 2) dA β could augment APPL loss-of-function, thus exacerbating its memory phenotype. It has been proposed that the physiological role of APP as a modulator of cell-cell and cell-substratum adhesions in neurites and synapses may be disturbed by its interaction with A β (Bignante et al., 2013). Direct interactions between A β fibrils and APP have been observed, A β thus acting as a ligand to its own precursor to enhance APP multimerization, a potential toxic mechanism (Lorenzo et al., 2000; Van Nostrand et al., 2002; Shaked et al., 2006; Sola Vigo et al., 2009; Kedikian et al., 2010). A more recent study has shown that mimicking A β binding to APP in order to promote APP multimerization in viable neurons triggers the amyloidogenic pathway, resulting in increased BACE1 levels and A β production (Lefort et al., 2012). In our study, amyloid peptide toxicity may exacerbate APPL loss-of-function, thus potentiating memory decline. One hypothesis is that dA β -induced memory toxicity may result from a direct interaction between dA β and APPL. Altogether our data give further support to the proposal

that a deficit in the normal physiological role of APP underlies the initial development of AD. Binding of A β fibrils to the extracellular juxtamembrane domain of APP (Shaked et al., 2006; Sola Vigo et al., 2009; Kedikian et al., 2010) could trigger APP loss-of-function and increase β -secretase cleavage, a process that thus could cause a pathogenic feedback loop.

Acknowledgments

We thank D. Kretschmar (Portland, OR, USA) for the kind gift of fly lines. We also thank members of our laboratory for fruitful discussions and critical reading of the manuscript. TP was supported by a grant from the French Agence Nationale de la Recherche. IB was supported by the Région Ile-de-France.

References

- Almkvist O, Basun H, Wagner SL, Rowe BA, Wahlund LO, Lannfelt L (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein mirror cognition in a Swedish family with Alzheimer disease and a gene mutation. *Arch Neurol* 54:641–644.
- Anliker B, Müller U (2006) The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3:239–246.
- Aso Y, Grübel K, Busch S, Friedrich AB, Siwanowicz I, Tanimoto H (2009) The mushroom body of adult *Drosophila* characterized by GAL4 drivers. *J Neurogenet* 23:156–172.
- Beglopoulos V, Shen J (2006) Regulation of CRE-dependent transcription by presenilins: prospects for therapy of Alzheimer's disease. *Trends Pharmacol Sci* 27:33–40.
- Bignante EA, Heredia F, Morfini G, Lorenzo A (2013) Amyloid β precursor protein as a molecular target for amyloid β induced neuronal degeneration in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 34:2525–2537.
- Bour A, Little S, Dodart JC, Kelche C, Mathis C (2004) A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiol Learn Mem* 81:27–38.
- Bourdet I, Pr at T, Goguel V (2014) The full-length form of the *Drosophila* Amyloid Precursor Protein is involved in memory formation. Submitted.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82:239–259.
- Cai H, Wang Y, McCarthy D, Wen H, Borchelt DR, Price DL, Wong PC (2001) BACE1 is the major

- beta-secretase for generation of Abeta peptides by neurons. *Nat Neurosci* 4:233–234.
- Callaway E (2012) Alzheimer's drugs take a new tack. *Nature* 489:13–14.
- Carmine-Simmen K, Proctor T, Tschäpe J, Poeck B, Triphan T, Strauss R, Kretzschmar D (2009) Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* 33:274–281.
- Carter J, Lippa CF (2001) Beta-amyloid, neuronal death and Alzheimer's disease. *Curr Mol Med* 1:733–737.
- Chami L, Checler F (2012) BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and β -amyloid production in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 7:1–15.
- Chen Y, Huang X, Zhang Y, Rockenstein E, Bu G, Golde TE, Masliah E, Xu H (2012) Alzheimer's β -secretase (BACE1) regulates the cAMP/PKA/CREB pathway independently of β -amyloid. *J Neurosci* 32:11390–11395.
- Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the beta-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases beta-protein production. *Nature* 360:672–674.
- Cole SL, Vassar R (2007) The Alzheimer's disease beta-secretase enzyme, BACE1. *Mol Neurodegener* 2:22.
- Copanaki E, Chang S, Vlachos A, Tschäpe J-A, Müller UC, Kögel D, Deller T (2010) sAPP α antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Mol Cell Neurosci* 44:386–393.
- Corrigan F, Pham CLL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, van den Heuvel C, Cappai R (2011) The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res* 1378:137–143.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Miranda E, Page R, Curry JA, Duthie FAI, Gubb DC, Lomas DA (2005) Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132:123–135.
- Dahms SO, Hoefgen S, Roeser D, Schlott B, Gührs K-H, Than ME (2010) Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5381–5386.
- Dawkins E, Small DH (2014) Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*:n/a–n/a.
- Dislich B, Lichtenthaler SF (2012) The Membrane-Bound Aspartyl Protease BACE1: Molecular and Functional Properties in Alzheimer's Disease and Beyond. *Front Physiol* 3:8.
- Dubnau J, Tully T (1998) Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:407–444.
- Fahrenholz F (2007) Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr Alzheimer Res* 4:412–417.
- Fang L, Duan J, Ran D, Fan Z, Yan Y, Huang N, Gu H, Zhu Y (2012) Amyloid- β depresses excitatory

- cholinergic synaptic transmission in *Drosophila*. *Neurosci Bull* 28:585–594.
- Fellgiebel A, Kojro E, Müller MJ, Scheurich A, Schmidt LG, Fahrenholz F (2009) CSF APPs alpha and phosphorylated tau protein levels in mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 22:3–9.
- Finelli A, Kelkar A, Song H-J, Yang H, Konsolaki M (2004) A model for studying Alzheimer's Abeta42-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* 26:365–375.
- Förstl H, Kurz A (1999) Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249:288–290.
- Fukumoto H, Cheung BS, Hyman BT, Irizarry MC (2002) Beta-secretase protein and activity are increased in the neocortex in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1381–1389.
- Ghosh AK, Brindisi M, Tang J (2012) Developing β -secretase inhibitors for treatment of Alzheimer's disease: β -Secretase inhibitor drugs. *J Neurochem* 120:71–83.
- Goguel V, Belair A-L, Ayaz D, Lampin-Saint-Amaux A, Scaplehorn N, Hassan BA, Preat T (2011) *Drosophila* Amyloid Precursor Protein-Like Is Required for Long-Term Memory. *J Neurosci* 31:1032–1037.
- Graeber MB, Kösel S, Grasbon-Frodl E, Möller HJ, Mehraein P (1998) Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1:223–228.
- Gralle M, Botelho MG, Wouters FS (2009) Neuroprotective Secreted Amyloid Precursor Protein Acts by Disrupting Amyloid Precursor Protein Dimers. *J Biol Chem* 284:15016–15025.
- Greeve I, Kretschmar D, Tschäpe J-A, Beyn A, Brellinger C, Schweizer M, Nitsch RM, Reifegerste R (2004) Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J Neurosci* 24:3899–3906.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M, Chiba T, Kanekura K, Yamada M, Tsukamoto E, Kouyama K, Terashita K, Aiso S, Lin A, Nishimoto I (2003) Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J Neurochem* 84:864–877.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüllicke T, Kretschmar H, Koch C von, Sisodia S, Tremml P, Lipp H-P, Wolfner DP, Müller U (2000) Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members. *J Neurosci* 20:7951–7963.
- Heisenberg M (1998) What do the mushroom bodies do for the insect brain? An introduction. *Learn Mem* 5:1–10.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23:4106–4115.

- Holsinger RMD, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G (2002) Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann Neurol* 51:783–786.
- Hussain I, Powell D, Howlett DR, Tew DG, Meek TD, Chapman C, Gloger IS, Murphy KE, Southan CD, Ryan DM, Smith TS, Simmons DL, Walsh FS, Dingwall C, Christie G (1999) Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase. *Mol Cell Neurosci* 14:419–427.
- Iijima K, Chiang H-C, Hearn SA, Hakker I, Gatt A, Shenton C, Granger L, Leung A, Iijima-Ando K, Zhong Y (2008) Abeta42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. *PloS One* 3:e1703.
- Iijima K, Iijima-Ando K (2008) *Drosophila* models of Alzheimer's amyloidosis: the challenge of dissecting the complex mechanisms of toxicity of amyloid-beta 42. *J Alzheimers Dis* 15:523–540.
- Iijima K, Liu H-P, Chiang A-S, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y (2004) Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6623–6628.
- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5:52–77.
- Jonsson T et al. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488:96–99.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736.
- Kedikian G, Heredia F, Salvador VR, Raimunda D, Isoardi N, Heredia L, Lorenzo A (2010) Secreted amyloid precursor protein and holo-APP bind amyloid beta through distinct domains eliciting different toxic responses on hippocampal neurons. *J Neurosci* 88:1795–1803.
- Keene AC, Waddell S (2007) *Drosophila* olfactory memory: single genes to complex neural circuits. *Nat Rev Neurosci* 8:341–354.
- Knopman DS, Parisi JE, Salviati A, Floriach-Robert M, Boeve BF, Ivnik RJ, Smith GE, Dickson DW, Johnson KA, Petersen LE, McDonald WC, Braak H, Petersen RC (2003) Neuropathology of cognitively normal elderly. *J Neuropathol Exp Neurol* 62:1087–1095.
- Laird FM, Cai H, Savonenko AV, Farah MH, He K, Melnikova T, Wen H, Chiang H-C, Xu G, Koliatsos VE, Borchelt DR, Price DL, Lee H-K, Wong PC (2005) BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions. *J Neurosci* 25:11693–11709.
- Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI (2003) NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* 17:1090–1100.
- Lannfelt L, Basun H, Vigo-Pelfrey C, Wahlund LO, Winblad B, Lieberburg I, Schenk D (1995) Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer

- amyloid precursor protein mutation. *Neurosci Lett* 199:203–206.
- Lefort R, Pozueta J, Shelanski M (2012) Cross-linking of cell surface amyloid precursor protein leads to increased β -amyloid peptide production in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:10674–10685.
- Li R, Lindholm K, Yang L-B, Yue X, Citron M, Yan R, Beach T, Sue L, Sabbagh M, Cai H, Wong P, Price D, Shen Y (2004a) Amyloid beta peptide load is correlated with increased beta-secretase activity in sporadic Alzheimer's disease patients. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3632–3637.
- Li Y, Liu T, Peng Y, Yuan C, Guo A (2004b) Specific functions of *Drosophila* amyloid precursor-like protein in the development of nervous system and nonneural tissues. *J Neurobiol* 61:343–358.
- Lieber T, Kidd S, Young MW (2002) Kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* 16:209–221.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 3:460–464.
- Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH (2003) Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J Neurochem* 87:733–741.
- Luo L, Martin-Morris LE, White K (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849–3861.
- Luo L, Tully T, White K (1992) Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene. *Neuron* 9:595–605.
- Luo Y, Bolon B, Kahn S, Bennett BD, Babu-Khan S, Denis P, Fan W, Kha H, Zhang J, Gong Y, Martin L, Louis JC, Yan Q, Richards WG, Citron M, Vassar R (2001) Mice deficient in BACE1, the Alzheimer's beta-secretase, have normal phenotype and abolished beta-amyloid generation. *Nat Neurosci* 4:231–232.
- Mao Z, Roman G, Zong L, Davis RL (2004) Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:198–203.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243–254.
- McGuire SE, Deshazer M, Davis RL (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol* 76:328–347.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683–12688.
- Neve RL, McPhie DL, Chen Y (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 886:54–66.
- Ohno M, Cole SL, Yasvoina M, Zhao J, Citron M, Berry R, Disterhoft JF, Vassar R (2007) BACE1

- gene deletion prevents neuron loss and memory deficits in 5XFAD APP/PS1 transgenic mice. *Neurobiol Dis* 26:134–145.
- Osterwalder T, Yoon KS, White BH, Keshishian H (2001) A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12596–12601.
- Pan D, Rubin GM (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271–280.
- Pascual A, Pr at T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
- Poeck B, Strauss R, Kretschmar D (2012) Analysis of amyloid precursor protein function in *Drosophila melanogaster*. *Exp Brain Res* 217:413–421.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenue A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456–1464.
- Randall AD, Witton J, Booth C, Hynes-Allen A, Brown JT (2010) The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology* 59:243–267.
- Refolo LM, Eckman C, Prada CM, Yager D, Sambamurti K, Mehta N, Hardy J, Younkin SG (1999) Antisense-induced reduction of presenilin 1 expression selectively increases the production of amyloid beta42 in transfected cells. *J Neurochem* 73:2383–2388.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Muller UC (2007) The Secreted β -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APPs Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice. *J Neurosci* 27:7817–7826.
- Roberds SL et al. (2001) BACE knockout mice are healthy despite lacking the primary beta-secretase activity in brain: implications for Alzheimer's disease therapeutics. *Hum Mol Genet* 10:1317–1324.
- Rockenstein E, Mante M, Alford M, Adame A, Crews L, Hashimoto M, Esposito L, Mucke L, Masliah E (2005) High beta-secretase activity elicits neurodegeneration in transgenic mice despite reductions in amyloid-beta levels: implications for the treatment of Alzheimer disease. *J Biol Chem* 280:32957–32967.
- Roman G, Endo K, Zong L, Davis RL (2001) P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12602–12607.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273:1227–1231.
- Sambamurti K, Suram A, Venugopal C, Prakasam A, Zhou Y, Lahiri DK, Greig NH (2006) A Partial Failure of Membrane Protein Turnover May Cause Alzheimers Disease: A New Hypothesis. *Curr Alzheimer Res* 3:81–90.
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Beher D, Bayer TA, Beyreuther K,

- Multhaup G (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.
- Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz F, Schroeder A (2006) Over-expression of two different forms of the alpha-secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 175:278–284.
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 278:169–172.
- Shaked GM, Kummer MP, Lu DC, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH (2006) Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB J* 20:1254–1256.
- Shimada T, Kato K, Kamikouchi A, Ito K (2005) Analysis of the distribution of the brain cells of the fruit fly by an automatic cell counting algorithm. *Physica* 350:144–149.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 402:537–540.
- Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Craddock SD, Culwell AR, Rydel RE, Mattson MP (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic brain injury. *J Neurochem* 63:781–784.
- Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Müller U, Kins S, Beyreuther K (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24:3624–3634.
- Sola Vigo F, Kedikian G, Heredia L, Heredia F, Añel AD, Rosa AL, Lorenzo A (2009) Amyloid-beta precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid beta through Go protein activation. *Neurobiol Aging* 30:1379–1392.
- Soldano A, Okray Z, Janovska P, Tmejová K, Reynaud E, Claeys A, Yan J, Atak ZK, De Strooper B, Dura J-M, Bryja V, Hassan BA (2013) The Drosophila Homologue of the Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Modulator of Wnt PCP Signaling. *PLoS Biol* 11:e1001562.
- Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkankung der Hirnrinde." *Clin Anat* 8:429–431.
- Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC (2008) Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis* 31:250–260.
- Thathiah A, De Strooper B (2011) The role of G protein-coupled receptors in the pathology of Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 12:73–87.
- Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615–29619.

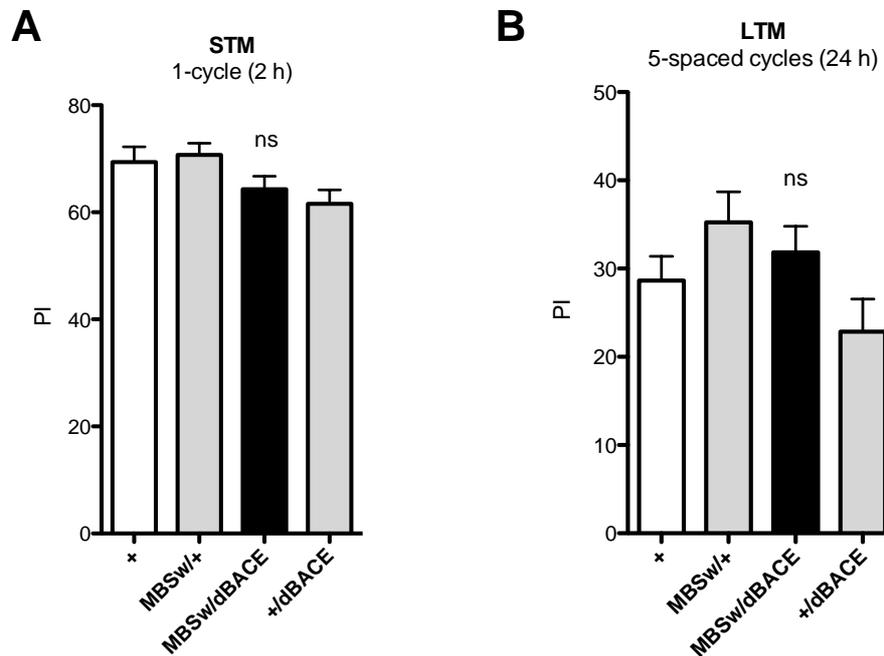
- Torroja L, Luo L, White K (1996) APPL, the Drosophila member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons. *J Neurosci* 16:4638–4650.
- Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999) The Drosophila beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:7793–7803.
- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in Drosophila. *Cell* 79:35–47.
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant Drosophila melanogaster. *J Comp Physiol* 157:263–277.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70:1–32.
- Van Nostrand WE, Melchor JP, Keane DM, Saporito-Irwin SM, Romanov G, Davis J, Xu F (2002) Localization of a fibrillar amyloid beta-protein binding domain on its precursor. *J Biol Chem* 277:36392–36398.
- Vassar R et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735–741.
- Vassar R (2001) The beta-secretase, BACE: a prime drug target for Alzheimer's disease. *J Mol Neurosci* 17:157–170.
- Vassar R, Kovacs DM, Yan R, Wong PC (2009) The γ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential. *J Neurosci* 29:12787–12794.
- Vincent B, Checler F (2012) α -Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins. *Curr Alzheimer Res* 9:140–156.
- Vincent B, Govitrapong P (2011) Activation of the α -secretase processing of A β PP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2:75–94.
- Wentzell JS, Bolkan BJ, Carmine-Simmen K, Swanson TL, Musashe DT, Kretzschmar D (2012) Amyloid precursor proteins are protective in Drosophila models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46:78–87.
- Wolfe MS (2008) Selective amyloid- β lowering agents. *BMC Neurosci* 9:S4.
- Xia W, Wong ST, Hanlon E, Morin P (2012) γ -Secretase modulator in Alzheimer's disease: shifting the end. *J Alzheimers Dis* 31:685–696.
- Yan R, Bienkowski MJ, Shuck ME, Miao H, Tory MC, Pauley AM, Brashier JR, Stratman NC, Mathews WR, Buhl AE, Carter DB, Tomasselli AG, Parodi LA, Heinrikson RL, Gurney ME (1999) Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity. *Nature* 402:533–537.
- Yang L-B, Lindholm K, Yan R, Citron M, Xia W, Yang X-L, Beach T, Sue L, Wong P, Price D, Li R, Shen Y (2003) Elevated beta-secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic

Alzheimer disease. *Nat Med* 9:3–4.

Zhao X-L, Wang W-A, Tan J-X, Huang J-K, Zhang X, Zhang B-Z, Wang Y-H, YangCheng H-Y, Zhu H-L, Sun X-J, Huang F-D (2010) Expression of beta-amyloid induced age-dependent presynaptic and axonal changes in *Drosophila*. *J Neurosci* 30:1512–1522.

Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6:27.

Figures

**Figure 1.** dBACE overexpression in adult MB does not alter memory

Flies were fed with RU for 48 h before conditioning to induce dBACE transgene expression. (A) STM assessed 2 h after one training session is not affected. The score of *MBSw/dBACE* flies is not different from that of one of the genetic control groups ($F_{(3,96)} = 3.08$, $*p < 0.05$, $n \geq 19$, Newman-Keuls post-hoc *MBSw/dBACE* vs *MBSw/+* or *+/dBACE*, $p > 0.05$). (B) LTM assessed 24 h after 5-spaced conditioning is not affected by dBACE overexpression ($F_{(3,61)} = 2.57$, $p > 0.05$, $n \geq 13$). Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index.

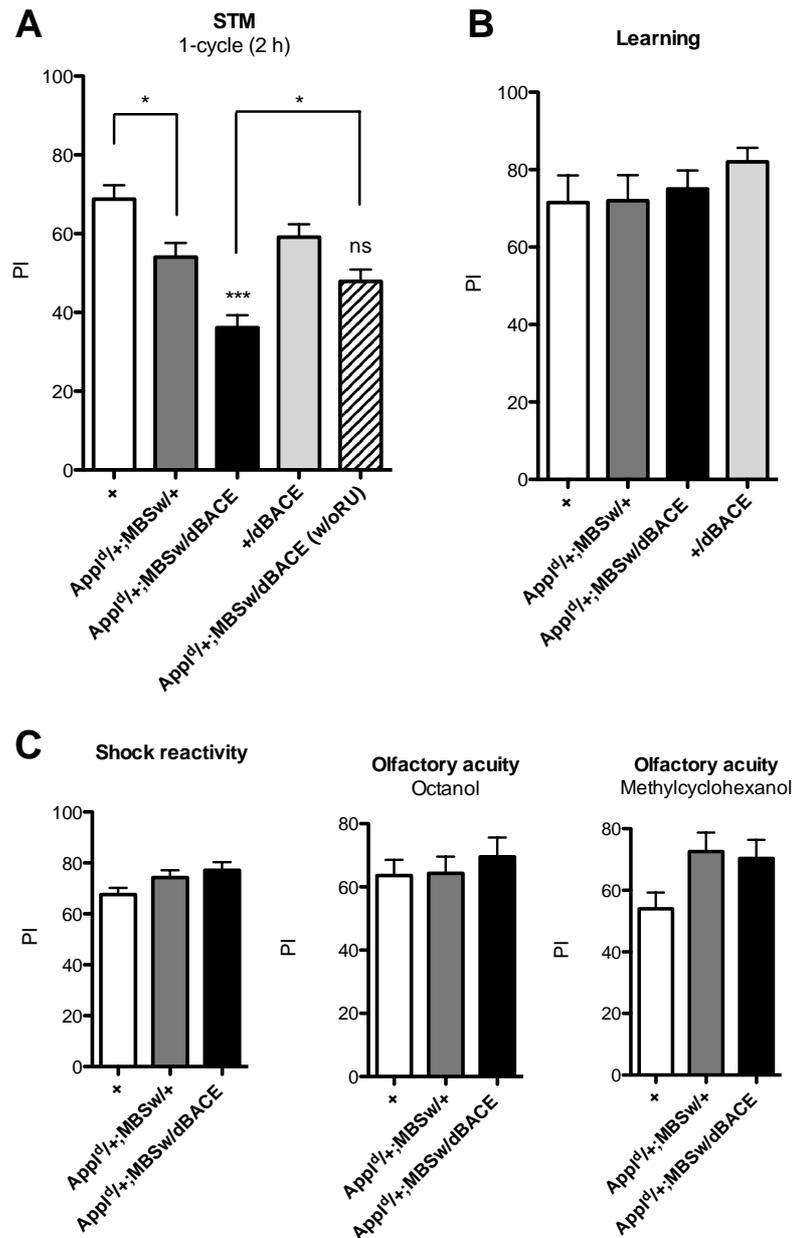


Figure 2. dBACE overexpression exacerbates the memory deficit caused by APPL partial loss-of-function

Unless indicated (w/o RU), flies were fed with RU for 48 h prior to conditioning. (A) Flies were submitted to one cycle training and tested 2 h later. *App1^{d/+};MBSw/dBACE* flies exhibit a STM score significantly lower than the genetic controls ($F_{(4,101)} = 11.99$, $***p < 0.0001$, $n \geq 14$). *App1^{d/+};MBSw/dBACE* flies fed or not (w/o RU) with RU display STM scores significantly different (Newman-Keuls post-hoc, $*p < 0.05$). (B) Learning is not affected. To assess learning, flies were tested immediately after one cycle training ($F_{(3,37)} = 0.61$, $p = 0.6110$, $n \geq 8$). (C) Neither shock reactivity ($F_{(2,21)}$, $p = 0.0896$, $n \geq 7$) nor olfactory acuity (octanol, $F_{(2,46)}$, $p = 0.7073$, $n \geq 15$; methylcyclohexanol, $F_{(2,52)}$, $p = 0.0610$, $n \geq 17$) is impaired. Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index.

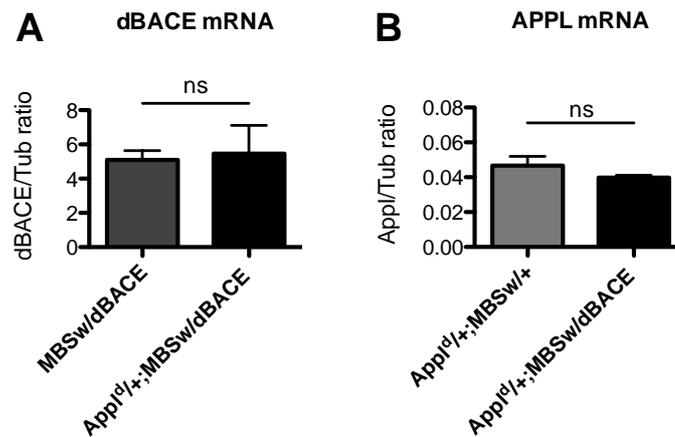


Figure 3. Analysis of *dBACE* and *Appl* transcription

Quantitative PCR analyses. Flies were fed for 48 h with RU prior to total RNA extraction from *MBSw/+*, *MBSw/dBACE*, *Appl^{d/+};MBSw/+* and *Appl^{d/+};MBSw/dBACE* heads. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results shown are ratios to the reference. (A) Quantification of *dBACE* mRNA level (t test, $p = 0.8376$, $n = 4$). (B) Quantification of *Appl* mRNA level (t test, $p = 0.2330$, $n = 3$). Bars, Mean \pm SEM. ns, not significant.

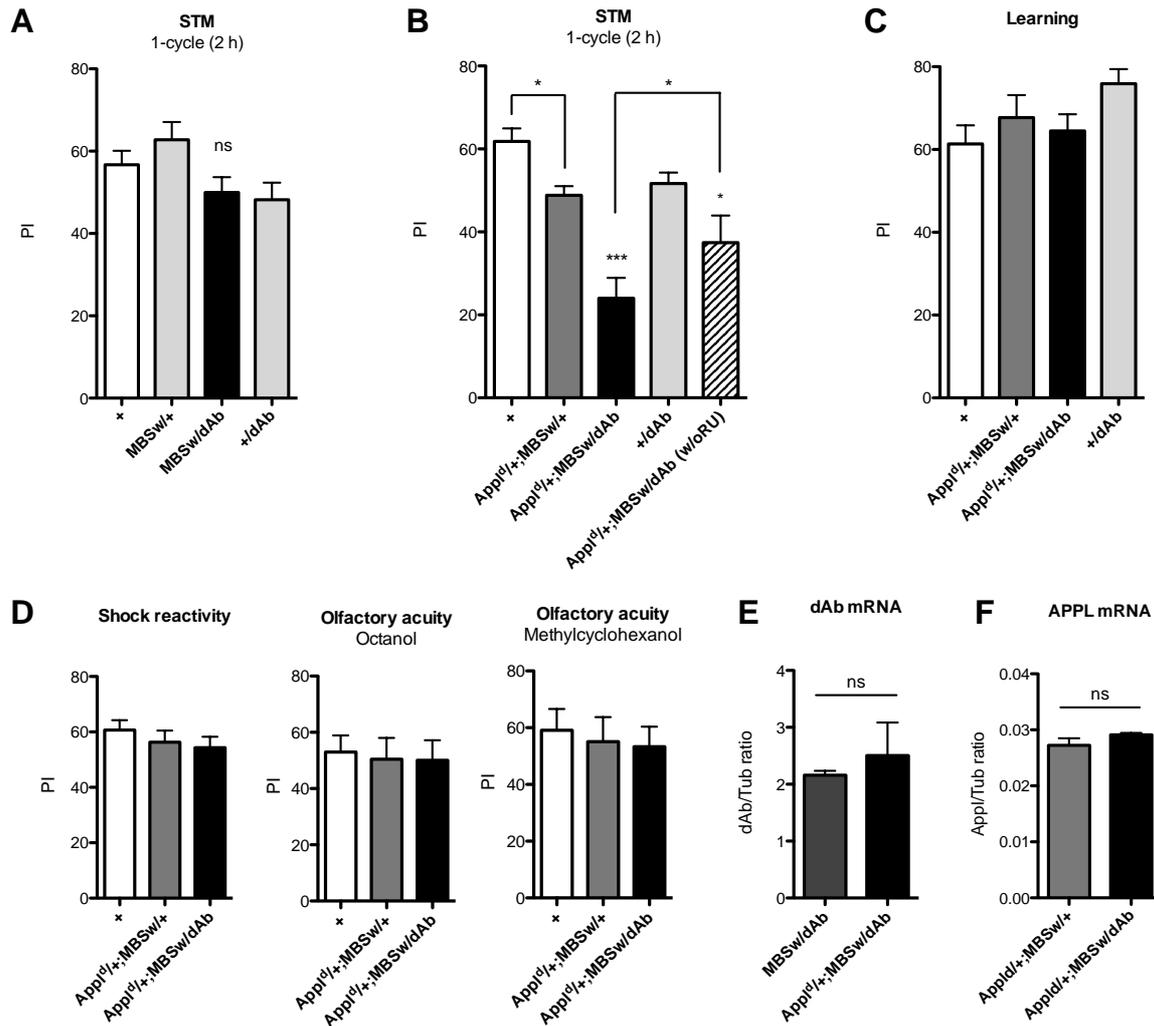


Figure 4. *dAb* expression alters memory only when associated with APPL partial loss-of-function

Unless indicated (C, w/o RU), flies were fed with RU for 48 h prior to either conditioning or mRNA extraction. (A-B) Flies were submitted to one cycle training and memory was tested 2 h later. (A) *MBSw/dAb* flies exhibit a normal STM score ($F_{(3,71)} = 2.56$, $p > 0.05$, $n \geq 13$). (B) *App^{l^d/+};MBSw/dAb* flies display a STM score significantly decreased compared to the controls ($F_{(4,117)} = 13.88$, $***p < 0.0001$, $n \geq 19$). *App^{l^d/+};MBSw/dAb* flies fed or not (w/o RU) with RU display STM scores significantly different (Newman-Keuls post-hoc, $*p < 0.05$). (C) Learning is not affected. To assess learning, flies were submitted to one cycle training and tested immediately after ($F_{(3,42)} =$, $p = 0.1605$, $n \geq 9$). (E) *App^{l^d/+};MBSw/dAb* flies exhibit wild-type shock reactivity ($F_{(2,34)}$, $p = 0.4992$, $n \geq 11$), as well as wild-type olfactory acuity (octanol, $F_{(2,34)}$, $p = 0.9506$, $n \geq 11$; methylcyclohexanol, $F_{(2,35)}$, $p = 0.8670$, $n = 12$). (F, G) Quantitative PCR analyses. RNA was extracted from *MBSw/+*, *MBSw/dAb*, *App^{l^d/+};MBSw/+* and *App^{l^d/+};MBSw/dAb* fly heads. Resulting cDNA was quantified using tubulin (Tub) expression as a reference. Results shown are ratios to the reference. (F) Quantification of *dAb* mRNA level. PCR reactions were conducted with primers specific of the *UAS-dAb* construct (t test, $p = 0.5788$, $n = 2$). (G) Quantification of *App^l* mRNA level (t test, $p = 0.1931$, $n = 2$). Bars, Mean \pm SEM. PI, Performance index. ns, not significant.

Résultats additionnels

Il existe une compatibilité inter-espèces entre les protéines APP et APPL, et leurs protéases respectives. Notamment, il a été montré que la β -sécrétase humaine BACE1 peut cliver APPL (Carmin-Simmen et al., 2009). Nous avons testé l'incidence sur la mémoire de la surexpression de BACE1 dans les CPs adultes (Figure 24). Les performances testées 2 h après 1 cycle de conditionnement des mouches *MBSw/BACE1* ne sont pas différentes de celles de leurs contrôles génétiques (Figure 24A, $F_{(2,31)}$, $p = 0.1763$, $n \geq 10$), ce qui montre que la surexpression de BACE1, tout comme celle de dBACE, dans un contexte génétique sauvage n'affecte pas la STM.

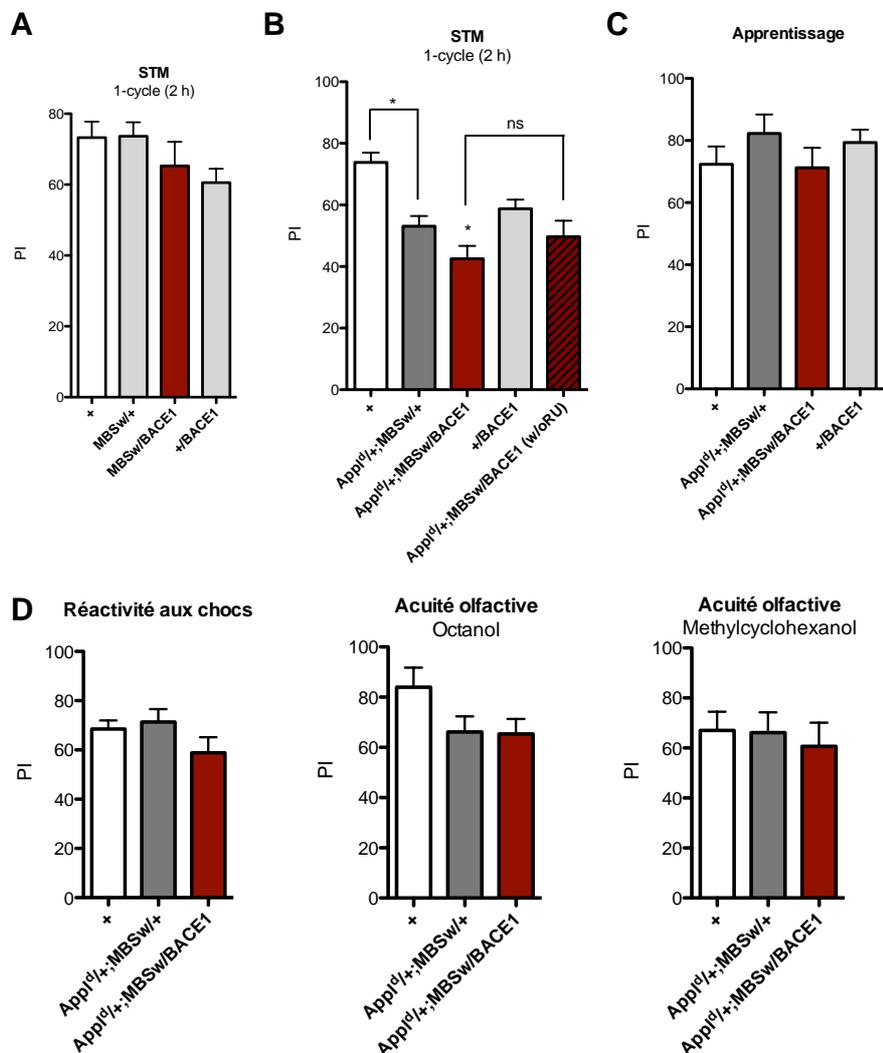


Figure 24. La surexpression de BACE1 dans les CPs adultes affecte la STM lorsqu'elle est associée à une perte de fonction APPL partielle.

Les histogrammes représentent la moyenne des index de performance \pm SEM. Les astérisques correspondent à la moins significative des comparaisons post-hoc. PI, Performance index.

Chez des mouches hétérozygotes *App1^{d/+};MBSw/+* qui présentent un défaut de mémoire à 2 h par rapport aux mouches sauvages (Figure 24B, t test, $p = 0.2849$, $n \geq 23$), l'expression de BACE1 aggrave le déficit de STM ($F_{(2,74)}$, $**p < 0.005$, $n \geq 23$). Les performances des mouches *App1^{d/+};MBSw/BACE1* ne sont pas différentes de celles des mouches *App1^{d/+};MBSw/BACE1* non nourries sur milieu RU (t test, $p = 0.2849$, $n \geq 23$) mais ces dernières présentent un score de mémoire à 2 h qui n'est pas non plus différent de celui des groupes contrôles ($F_{(2,73)}$, $p = 0.2305$, $n \geq 23$), ce qui ne permet pas de conclure formellement sur un effet de BACE1 pendant le développement ou chez l'adulte. En revanche, l'expression de BACE1 dans les CPs des hétérozygotes *App1^{d/+};MBSw/+* n'affecte pas leur capacité d'apprentissage (Figure 24C, $F_{(2,23)}$, $p = 0.3748$, $n \geq 7$), ce qui suggère que les structures neuronales de la mémoire olfactive sont préservées. L'acuité olfactive des mouches *App1^{d/+};MBSw/BACE1* pour l'octanol (Figure 24D, $F_{(2,23)}$, $p = 0.1092$, $n = 8$) et le méthylcyclohexanol ($F_{(2,23)}$, $p = 0.8525$, $n \geq 7$) est normale, tout comme leur réactivité aux chocs électriques ($F_{(2,17)}$, $p = 0.2303$, $n = 6$). Ces résultats qui indiquent une conservation fonctionnelle entre les β -sécrétases humaine et drosophile, confortent ceux obtenus lors de l'analyse de dBACE.

DISCUSSION

La MA est une pathologie complexe et multifactorielle qui résulte de la combinaison de plusieurs facteurs génétiques et environnementaux. La singularité de cette maladie réside dans la présence de lésions cérébrales particulières, qui ont été désignées comme les responsables du dysfonctionnement mnésique. Néanmoins, l'étiologie de la MA reste incertaine et débattue : l'hypothèse prédominante stipule que la démence caractéristique de la maladie est causée par l'accumulation pathologique du peptide A β , mais elle pourrait aussi résulter de l'altération d'autres voies moléculaires, non encore identifiées, qui mèneraient ultimement à l'accumulation d'A β . Deux objectifs se dégagent de cette problématique: 1) développer des modèles qui permettent *in vivo* d'analyser de manière isolée la toxicité d'A β pour la fonction mnésique, 2) étudier le rôle physiologique de son précurseur APP dans la mémoire, et la contribution éventuelle de son dysfonctionnement dans les déficits mnésiques.

APPL est impliquée dans la mémoire

Étudier le rôle d'APP dans la mémoire présuppose de pouvoir moduler son niveau d'expression et d'en étudier l'impact à un niveau fonctionnel. Deux éléments compliquent ce type d'étude : 1) la redondance fonctionnelle qui existe chez la souris (Heber et al., 2000), et 2) le rôle important joué par APP au cours du développement, comme en témoigne la létalité du triple KO (Herms et al., 2004). Jusqu'à maintenant, la plupart des modèles d'étude ont reposé sur la surexpression d'APP. Néanmoins, surexprimer APP induit l'augmentation de peptides amyloïdes toxiques, et comprendre la part relative de chacun - APP et A β - dans les phénotypes observés s'avère une tâche complexe.

La drosophile permet de manipuler l'expression de l'unique orthologue *App1* dans des structures neuronales choisies. En 2011, notre équipe a montré que l'inhibition d'APPL dans les CPs de mouches adultes induit un défaut spécifique de LTM aversive (Goguel et al., 2011). La LTM est une mémoire coûteuse en énergie (Mery and Kawecki, 2005) dont la formation requiert une synthèse protéique *de novo* (Tully et al., 1994). Ce type de mémoire consolidée met en jeu des plasticités synaptique et structurale, et repose sur la modulation de l'expression de plusieurs gènes (Yin et al., 1995). De façon intéressante, la partie intracellulaire de son orthologue APP de mammifère a été désignée comme un régulateur de la transcription.

L'AICD régule l'expression de gènes parmi lesquels l'on retrouve des facteurs pro-apoptotiques, les Néprilysines ou encore APP lui-même (Beckett et al., 2012). Cette fonction a été longtemps débattue et il est probable que la liste actuelle des gènes cibles soit incomplète. Une étude avait suggéré que le clivage d'APP par BACE1 puisse moduler positivement la mémoire via l'AICD (Ma et al., 2007). L'on peut envisager que l'AICD d'APPL soit également un activateur de transcription et qu'il puisse réguler l'expression de gènes spécifiquement impliqués dans les processus de consolidation de la LTM. Pour étudier cette hypothèse, nous pourrions surexprimer l'AICD d'APPL dans les CPs de mouches *App^Δ/+* pendant la phase de consolidation de la LTM, et observer si cela permet de sauver leur déficit de mémoire. Si tel était le cas, nous pourrions conclure que l'AICD est impliqué dans la mise en place de la LTM.

En plus d'un défaut de LTM, une forte inhibition d'APPL induit un défaut de STM

En utilisant un ARNi plus efficace que ceux précédemment publiés (Goguel et al., 2011), nous avons observé que l'inhibition de l'expression d'APPL dans les CPs de mouches adultes cause, en plus d'un défaut de LTM, un défaut de STM. Ainsi, une réduction importante de l'expression d'APPL provoque des défauts de STM et de LTM.

Des travaux complémentaires menés au laboratoire montrent que le défaut de STM induit par l'inhibition d'APPL n'affecte que la partie labile de la mémoire induite par un cycle de conditionnement, la ARM présente à 2 h étant préservée. Nous avons également observé que l'inhibition d'APPL n'affecte pas la ARM présente à 24 h après un conditionnement massé. L'ensemble de ces résultats montre qu'APPL est impliquée spécifiquement dans la voie labile/LTM. La mémoire labile formée après un conditionnement olfactif aversif et la LTM sont à l'heure actuelle considérées comme deux mémoires formées successivement, la première étant consolidée en LTM par la répétition du conditionnement par le protocole espacé. Nos résultats suggèrent que le niveau d'inhibition d'APPL corrèle avec la « gravité » du phénotype de mémoire : une inhibition faible d'APPL n'affecte que la LTM, alors qu'une inhibition plus forte altère à la fois la STM et la LTM. Deux hypothèses sont possibles : 1) APPL est impliquée dans un mécanisme unique, commun à la formation de la mémoire labile et de la LTM, mais qui dépend du niveau d'APPL (homéostasie calcique, intégration de l'information, etc), et 2) APPL est requise pour deux fonctions distinctes, l'une, spécifique de la LTM, est perturbée par une faible dérégulation du niveau d'APPL (modulation de la plasticité synaptique et structurale, contrôle de la transcription), l'autre, commune à la mémoire labile et à la LTM, est plus robuste face à la perte de fonction APPL.

L'identification de domaines d'APPL spécifiquement impliqués dans l'une ou l'autre de ces mémoires pourrait permettre de trancher en faveur de l'une ou l'autre de ces hypothèses.

Afin de tester si une inhibition encore plus forte d'APPL pourrait affecter l'apprentissage, nous avons généré des mouches homozygotes pour le pilote d'expression et pour la construction codant l'ARNi. Nous avons aussi analysé des mouches hétérozygotes *Appl^d/+* exprimant cet ARNi. Dans aucun cas nous n'avons observé de défaut de mémoire immédiate, suggérant que l'expression d'APPL n'est pas requise pour l'apprentissage. Pour valider cette hypothèse, il faudrait pouvoir étudier une perte de fonction totale. Le mutant nul constitutif n'est pas analysable car il présente un défaut de réactivité aux chocs électriques, vraisemblablement causés par des défauts de développement. Il faudrait alors pouvoir générer un mutant nul au stage adulte uniquement. Les outils génétiques disponibles actuellement pour effectuer du remplacement de gènes chez l'adulte semblent compliqués à mettre en œuvre dans les CPs.

Une alternative consisterait à utiliser le second paradigme de mémoire associative que nous étudions au laboratoire : la mémoire appétitive. Cette mémoire repose sur l'association d'une odeur avec une présentation de sucre ; les mouches ayant été au préalable mises à jeuner afin qu'elles soient motivées par la présentation de sucre. Si les mouches *Appl^d* s'avèrent capables de répondre comme des mouches sauvages à un test d'appétence au sucre, nous pourrions alors étudier leurs capacités d'apprentissage dans ce paradigme. Si les mouches *Appl^d* présentent un phénotype sauvage, nous pourrions conclure qu'APPL n'est pas requise pour l'étape de l'apprentissage. En revanche, l'observation d'un défaut ne nous permettrait pas de conclure qu'il s'agisse d'un défaut fonctionnel chez l'adulte.

Dans la littérature, la plupart des mutants de STM et de LTM sont aussi des mutants d'apprentissage. De manière intéressante, nous avons caractérisé au laboratoire des mutants qui semblent présenter les mêmes phénotypes de mémoire que les mutants APPL. Il s'agit de mutants affectant l'expression des Néprilysines, peptidases impliquées dans la dégradation de nombreux neuropeptides dont A β (Iwata et al., 2001). Ces résultats suggèrent qu'une même voie impliquant APPL et dA β serait mise en jeu dans la formation de la mémoire.

De façon intéressante, les deux voies de maturation d'APP sont augmentées par l'AMPC, (Canepa et al., 2013). Or l'AMPC est synthétisée via l'adénylate cyclase au cours de l'apprentissage chez la drosophile (Gervasi et al., 2010). Est-ce que la voie de signalisation de l'AMPC pourrait moduler la protéolyse d'APPL pour libérer des fragments nécessaires à la mise en place de la mémoire?

Un autre élément de la structure protéique d'APPL permet de la relier à la voie AMPc/PKA. APPL présente dans sa séquence un site putatif de liaison aux protéines Go (Torroja et al., 1999b), or celles-ci sont couplées à de nombreuses cascades de signalisation, incluant la voie de l'adénylate cyclase (Carter et Medzihradsky, 1993). L'APP humain, et même l'APPL du papillon *Manduca* interagissent directement avec les protéines Go (Okamoto et al., 1995; Brouillet et al., 1999; Ramaker et al., 2013), ce qui suggère que cette fonction est conservée au cours de l'évolution. L'interaction APP-Go pourrait aussi être impliquée dans la MA. En effet, dans le cerveau des patients atteints de la MA, l'activité des protéines G est augmentée et l'interaction APP-Go diminuée (Reis et al, 2007; Shaked et al, 2009.). L'activation des protéines Go implique généralement la liaison d'un ligand à un récepteur présent à la surface cellulaire, ce qui appuie l'hypothèse selon laquelle APP est un récepteur membranaire. L'interaction d'APP-Go régule l'homéostasie calcique (Shaked et al., 2009), plus particulièrement APP module positivement la concentration de calcium dans les compartiments intracellulaires (Hamid et al., 2007). Chez la drosophile, le transfert des informations olfactives vers les CPs engage une élévation de la concentration de calcium intracellulaire dépendante des protéines G (Wang et al., 2008) qui participe à la mémoire olfactive. Est-ce que ce mécanisme pourrait participer à l'homéostasie calcique dans les CPs, et ainsi moduler leur excitabilité et la transmission des informations mnésiques ? Nous disposons au laboratoire de techniques d'imagerie calcique qui permettent de caractériser les traces mnésiques, autrement dit les changements de niveau du calcium dans les CPs après conditionnement olfactif. Nous aimerions ouvrir cette piste de recherche en comparant les traces mnésiques présentes chez des mouches déficientes pour *App1* et des mouches sauvages, après conditionnement olfactif.

La stratégie que nous avons mise en place pour caractériser le rôle d'APPL dans la mémoire olfactive chez la drosophile adulte a été d'analyser le sauvetage potentiel du défaut de mémoire induit par la perte de fonction partielle d'APPL, en exprimant des formes mutées d'APPL dans les CPs. Nous avons pour cela utilisé les mouches hétérozygotes *App1^{d/+};MBSw/+* qui présentent un fort défaut de LTM, un léger défaut de STM, mais pas de défaut d'apprentissage.

Chez ces mouches, le niveau d'APPL est diminué de façon constitutive et ubiquitaire, et l'on pourrait envisager que cela ait un impact sur leur développement. Néanmoins, deux études ont démontré que les hétérozygotes *App1^{d/+}* ne présentent aucun défaut de développement détectable au niveau des CPs adultes, et notamment des lobes β impliqués

dans la STM (Li et al., 2004; Soldano et al., 2013). On peut donc raisonnablement écarter l'hypothèse selon laquelle les défauts de mémoire observés chez les mouches *App1^{d/+};MBSw/+* résulte d'un défaut de développement causé par l'inhibition constitutive d'*App1*. D'autre part, l'expression de plusieurs formes mutées d'APPL, restreinte dans les CPs chez l'adulte, permet de restaurer à un niveau sauvage les performances de STM des hétérozygotes *App1^{d/+};MBSw/+*. Nous concluons donc que le défaut de mémoire de ces mouches hétérozygotes *App1^{d/+};MBSw/+* n'est pas causé par un défaut de développement ni par la diminution ubiquitaire de la protéine APPL, mais qu'il s'agit d'un défaut fonctionnel causé par la réduction de l'expression d'APPL dans les CPs de mouches adultes.

Les formes sécrétée et non-protéolysée d'APPL sont requises conjointement pour la mémoire à court-terme

APPL^s compense la perte partielle d'APPL pour l'établissement de la STM

Plusieurs études chez les mammifères ont démontré un rôle bénéfique de la forme sAPP α dans la mémoire (Meziane et al., 1998; Bour et al., 2004; Ring et al., 2007; Taylor et al., 2008). Nous avons donc initié notre étude en analysant l'effet de l'expression de la forme sécrétée d'APPL sur le défaut de STM de drosophiles *App1^{d/+};MBSw/+*. Les sites de clivage d'APPL n'étant pas caractérisés, il a été générée une forme sécrétée APPL^s « artificielle », déletée des 129 acides aminés C-terminaux (Wentzell et al., 2012). Une telle protéine correspond à l'ectodomaine d'APPL et est constitutivement sécrétée (Torroja et al., 1999b).

L'expression d'APPL^s dans les CPs d'hétérozygotes *App1^{d/+};MBSw/+* permet de restaurer la STM à un niveau égal à celui de mouches sauvages, démontrant qu'APPL sécrétée joue un rôle dans la mise en place de la STM. Cette observation, en accord avec les données obtenues chez les mammifères, permet de supposer que la forme APPL^s utilisée dans notre étude se rapproche fonctionnellement de la forme sAPP α . Il a été proposé, sur la base des poids moléculaires des fragments CTF α et CTF β , résultants des clivages d'APPL par KUZ et par dBACE, respectivement, que les sites de coupure α et β dans la séquence APPL soient inversés par rapport à ceux d'APP (Carmine-Simmen et al., 2009). Si tel est le cas, contrairement à ce qui est observé chez les mammifères, sAPP α devrait être plus courte que sAPP β . Or, puisque le codon stop inséré pour créer APPL^s a été placé du côté N-terminal de la région présumée contenir les sites de coupure α et β , APPL^s doit correspondre à la plus courte des deux formes sécrétées d'APPL, autrement dit sAPP α . Notre observation

qu'APPL^s est bénéfique pour la mémoire est en accord avec cette hypothèse, et suggère qu'il existe encore une fois une conservation fonctionnelle entre les fragments APP et APPL.

Dans quelle structure neuronale APPL^s agit-elle ?

Torroja et al. (1996) ont analysé la distribution d'APPL dans le système nerveux. Pour différencier la répartition des formes sécrétées et membranaires d'APPL, ils surexprimèrent sous contrôle d'un promoteur *heat-shock* des formes mutantes d'APPL dans un contexte *App^{l^d}* (Torroja et al., 1996). Ils observèrent que dans le cerveau adulte, APPL^s se répartit de façon variable dans l'ensemble du neuropile. Dans notre étude, APPL^s est exprimée et sécrétée par les CPs. Nous ne pouvons donc savoir dans quelle structure cérébrale elle joue un rôle pour la mémoire. APPL^s pourrait tout aussi bien interagir avec une protéine présente à la surface des CPs qu'avec des structures plus lointaines. La séquence APPL^s que nous utilisons est fusionnée à une séquence HA (Wentzell et al., 2012) dont nous pourrions tirer avantage pour déterminer sa localisation par des expériences d'immuno-histologie.

Favoriser la formation d'APPL sécrétée endogène révèle que la forme membranaire est aussi requise pour la STM

Dans le but de favoriser la production endogène de sAPPL α , nous avons surexprimé l' α -sécrétase. La surexpression de KUZ dans les CPs n'affecte pas la STM ce qui démontre qu'augmenter la protéolyse de ses substrats potentiels dans les CPs n'a pas d'effet délétère sur la STM. En revanche, et de manière surprenante, la surexpression de KUZ chez les hétérozygotes *App^{l^d}/+ ;MBS^{w/+}*, non seulement n'exerce pas d'effet bénéfique comme on aurait pu s'y attendre, mais au contraire s'avère délétère, puisqu'elle aggrave le déficit de STM. Le fait que la surexpression de KUZ 1) n'affecte pas la STM dans un contexte APPL sauvage, mais 2) aggrave le défaut de STM dans un contexte où l'expression d'APPL est réduite, suggère très fortement que le défaut de STM observé est lié à APPL. La surexpression de KUZ dans les CPs de mouches *App^{l^d}/+ ;MBS^{w/+}* génère une augmentation des formes solubles d'APPL, mais aussi une diminution des formes membranaires. Les mesures réalisées dans le cerveau entier, alors que KUZ n'est surexprimée que dans les CPs, indiquent une augmentation importante de la synthèse de sAPPL α , et une diminution importante de la forme non protéolysée endogène, dans les CPs. Puisque nous avons vu précédemment que l'expression d'APPL^s exerce un effet positif sur la STM, il apparaissait très peu probable que l'aggravation du phénotype de mémoire causée par la surexpression de KUZ soit liée à l'augmentation des formes solubles. Nous avons donc émis l'hypothèse

qu'elle puisse être causée par la diminution de la forme membranaire non protéolysée d'APPL.

Pour tester cette hypothèse, nous avons utilisé la protéine APPL^{sd}, une forme délétée des sites de clivage par les α - et β -sécrétase, et qui en conséquence reste de manière constitutive à la membrane. La surexpression d'APPL^{sd}, dans les CPs adultes de mouches *App1^{d/+};MBSw/+* a permis de restaurer une STM sauvage. Ce résultat est la première démonstration que la forme complète d'APPL est impliquée dans la mémoire.

Augmenter l'activité de l' α -sécrétase comme traitement de la MA (Fahrenholz, 2007) a été envisagé pour deux raisons : d'une part, l' α -sécrétase promeut la sécrétion du fragment neuroprotecteur sAPP α , et d'autre part, augmenter son activité pourrait se faire au détriment de la voie amyloïdogénique, et donc diminuer la formation du peptide amyloïde. Le bémol majeur d'une telle stratégie réside dans le fait qu'ADAM10, en plus d'APP, possède de nombreux autres substrats impliqués dans des fonctions cellulaires majeures, comme par exemple, Notch, ou les cadhérines (Vingtdeux and Marambaud, 2012). De plus, notre étude montre le danger qu'une telle stratégie ne génère une diminution fonctionnellement délétère de la forme complète d'APP.

La transcription du gène *homer*, l'homologue chez les mammifères d'Homer3 qui code une protéine qui se lie à APP et la stabilise à la membrane (Parisiadou et al., 2008), est régulée positivement après un conditionnement espacé chez la drosophile (Miyashita et al., 2012). Il pourrait s'agir là d'une boucle de régulation positive pour stabiliser et maintenir le pool d'APPL à la membrane plasmique.

Même si une telle fonction n'est pas clairement démontrée, il est suggéré depuis sa première description qu'APP soit un récepteur membranaire (Kang et al., 1987). Chez la drosophile, Torroja et al. (1996) analysèrent la répartition du mutant APPL^{sd} dans un contexte *App1^d*. Dans le cerveau adulte, APPL^{sd} est localisée principalement dans les axones des CPs, et ce à une concentration même plus élevée que celle de la protéine endogène. En revanche, APPL^{sd} est peu détectée au niveau des calices où se trouvent les dendrites et les corps cellulaires des cellules de Kenyon. Le fait qu'APPL^{sd} ne soit pas présente au niveau des somas suggère qu'elle est intégrée à la membrane plasmique après avoir été transportée aux axones. Cependant, il n'est pas possible de formellement définir d'après ces observations si APPL^{sd} se trouve à la surface cellulaire des axones ou dans le compartiment intracellulaire.

L'expression constitutive d'APPL^{sd} dans les CPs au cours du développement résulte en une altération de la morphologie des lobes β/β' qui prennent une apparence irrégulière et sont fusionnés au niveau de la ligne médiane. La forme membranaire d'APPL semble donc importante durant le développement des CPs en participant à la fasciculation des axones. (Li et al., 2004). Cette observation est un argument pour considérer qu'APPL^{sd} est localisée à la membrane plasmique : en effet, l'hypothèse la plus simple est que le défaut d'organisation de ces axones résulte d'une interaction directe cellule à cellule, altérée par la présence constitutive d'APPL à la surface de ces axones.

Chez le mutant *loe*, l'expression d'APPL^{sd}, contrairement à celle d'APPL^s, aggrave les phénotypes de neurodégénérescence (Wentzell et al., 2012). Les auteurs concluent que le domaine extracellulaire d'APPL doit être sécrété pour exercer son action neuroprotectrice, et qu'il serait le ligand d'une protéine non identifiée qui pourrait être APPL.

La surexpression constitutive et panneuronale d'APPL^{sd} induit un défaut de développement des ailes, et ce même en présence d'APPL endogène. APPL semble donc impliquée dans une fonction paracrine qui contrôle la formation de tissus, y compris non-neuronaux. Cette observation conforte l'hypothèse que la forme complète d'APPL agisse comme un récepteur membranaire.

Interaction fonctionnelle entre sAPPL et APPL

Les formes sécrétée et membranaire d'APPL coexistent tout au long du développement et de la vie de la drosophile, ayant chacune leur importance physiologique (Torroja et al., 1996). Nous avons mis en évidence que ces deux formes d'APPL sont impliquées dans la STM. Nous avons aussi montré que favoriser la production de l'une aux dépens de l'autre, en surexprimant KUZ, aggrave le déficit de STM lié à la perte partielle d'APPL. Cela suggère que les deux formes d'APPL sont requises conjointement pour la STM, et interagissent fonctionnellement. Ainsi dans un contexte génétique qui n'exprime déjà que 40 % du niveau sauvage d'APPL endogène, la surexpression de KUZ provoquerait une diminution accrue de la forme complète d'APPL dont la concentration se retrouverait alors en dessous du seuil permettant un sauvetage fonctionnel par la surexpression de la forme sécrétée.

Contrairement à ce que nous observons, pendant le développement, les deux formes semblent plutôt avoir des effets antagonistes. Dans les cultures de neuroblastes embryonnaires, l'expression d'APPL^s diminue la pousse des neurites tandis que celle d'APPL^{sd} l'augmente. L'expression conjointe des deux formes permet de retrouver un phénotype normal. Ainsi, leur

rôles seraient opposés mais de leur présence conjointe résulterait, comme chez l'adulte, une interaction fonctionnelle positive (Li et al., 2004).

Une hypothèse intéressante serait que les protéines sAPPL et APPL jouent le rôle d'un ligand et son récepteur dans la mémoire. Plusieurs arguments seraient en faveur d'une telle hypothèse : 1) Wentzell et al. (2012) ont montré par des expériences de co-immunoprécipitation une interaction physique entre APPL et sAPPL, et ils suggèrent que sAPPL soit un ligand pour son propre précurseur ; 2) chez les mammifères, une interaction directe entre sAPP α et des dimères d'APP a été mise en évidence par Gralle et al. (2009) dans des neuroblastes en culture. Lors d'une privation de glucose, la liaison de sAPP α à des homodimères APP inhibe l'activation des voies pro-apoptotiques. L'interaction des formes sécrétée et membranaire d'APP aurait donc un effet neuroprotecteur. Par ailleurs, la difficulté d'identifier des ligands pour APP est en faveur de l'hypothèse qu'APP soit en fait le récepteur de ses propres métabolites.

Pourquoi un rôle de la forme membranaire d'APP dans la mémoire n'a jamais été rapporté dans les études mammifères ?

Ring et al. (2007) montrèrent par des expériences de remplacement de gènes que l'expression de sAPP α , ou celle d'une protéine APP tronquée dans sa partie C-terminale (APP Δ CT15), compense les déficits liés à la perte d'APP : réduction du volume cérébral, diminution du poids et de la force des membres antérieurs, déficits d'apprentissage spatial et LTP. Ils concluent que la partie intracellulaire d'APP n'était pas essentielle pour ces processus. Néanmoins, dans cette étude, APLP-1 et APLP-2 étaient préservées. La redondance fonctionnelle entre les trois homologues est avérée (Heber et al., 2000), et il a de plus été montré que les trois protéines peuvent former des hétérodimères (Soba et al., 2005). Nous pensons donc que l'un de ces deux homologues a pu compenser la perte d'APP, et mener à la conclusion erronée que sAPP α est le seul domaine d'APP physiologiquement requis pour les paramètres analysés au cours de cette étude.

Les autres analyses réalisées chez les mammifères et démontrant un rôle positif de sAPP α dans la mémoire reposaient toutes sur l'injection de sérums sAPP α (Meziane et al., 1998; Bour et al., 2004; Taylor et al., 2008). Il est ainsi possible que les effets bénéfiques observés reposent en partie sur la présence de formes membranaires d'APP endogènes.

Tous les mutants APPL^{sd} non-protéolysables sauvent la mémoire

Afin d'identifier la fonction de la forme complète d'APPL dans la mémoire, nous avons voulu tester la capacité de plusieurs mutants APPL^{sd}, dépourvus de certains domaines protéiques, à sauver le déficit de STM des hétérozygotes *App1^d/+ ;MBSw/+*. De manière inattendue, toutes les formes testées se sont révélées capables de restaurer les performances de STM des hétérozygotes à un niveau sauvage. Nous avons vérifié que l'expression du mutant APPL^{sd} n'élève pas le niveau de transcription du gène *App1* endogène.

Il apparaît improbable que les ectodomains E1 et E2, le domaine intracellulaire, le site d'internalisation, et le domaine de fixation aux protéines Go, soit tous dispensables pour la fonction d'APPL dans la mémoire. Ainsi, nous pouvons émettre deux hypothèses principales pour expliquer nos résultats : 1) l'expression de n'importe laquelle des formes d'APPL^{sd} utilisée pourrait augmenter la quantité d'APPL membranaire endogène, par exemple en titrant un facteur tel que l' α -sécrétase. Cette hypothèse pourrait être testée en analysant les quantités respectives des formes solubles et membranaires d'APPL endogène, en présence de chacun des mutants APPL^{sd}, et 2) il est possible que les formes APPL^{sd} soient capables de former des dimères avec les formes sauvages endogènes, permettant ainsi de restaurer la fonction d'APPL. En effet, les formes APPL^{sd} ont conservé l'intégralité du domaine transmembranaire, et il a été récemment démontré qu'APP peut homodimériser par son domaine transmembranaire (Nadezhdin et al., 2012). A part la forme APPL^s, toutes les formes d'APPL utilisées au cours de notre étude étaient des formes constitutivement membranaires. Il serait utile par exemple de construire des constructions permettant l'expression de formes d'APPL strictement délétées du domaine E1, d'une part, et du domaine E2, d'autre part, et d'analyser leurs rôles respectifs dans la mémoire.

Au cours de ma thèse, nous avons analysé la capacité d'APPL^s, d'APPL^{sd} et de ses mutants dérivés, à sauver le défaut de STM. Nous avons choisi de commencer par tester la STM car un crible phénotypique de mémoire à 2 h est plus robuste et plus facile à réaliser qu'un crible à 24 h, et d'autre part car le phénotype de STM de la lignée *App1^d* est moins sensible à la dérive génétique que celui de LTM. Le projet est actuellement poursuivi en testant si ces mutants peuvent compenser le déficit de LTM induit par la perte de fonction partielle d'APPL. Si l'une de ces formes s'avère ne pas restaurer la LTM, alors l'on pourra conclure qu'APPL a bien deux rôles distincts dans la mise en place de la mémoire à 2 h et celle de la LTM.

S'il existe en effet un mécanisme spécifique de la LTM dans lequel APPL est impliquée, l'hypothèse la plus probable sera qu'il requiert l'activation des voies de signalisation intracellulaire. Le mutant APPL^{sd Δ C} est donc le meilleur candidat pour ne pas sauver la LTM. Comme il est habituellement difficile de conclure sur l'absence d'un sauvetage fonctionnel, nous espérons que les mutants plus spécifiques APPL^{sd Δ Cg} et APPL^{sd Δ NPTY} permettront l'un ou l'autre de sauver le défaut.

Chez le jeune adulte, l'expression de dA β exacerbe le déficit de mémoire causé par une perte de fonction partielle d'APPL

Une surproduction de dA β limitée et transitoire n'affecte pas la mémoire

Si la neurotoxicité d'A β est avérée, sa contribution dans l'apparition des déficits mnésiques caractéristiques de la MA est toujours débattue. En effet, les approches anti-amyloïdes se sont révélées inefficaces sur le plan clinique. Ces approches ont pour but de réduire la production d'A β , et/ou d'empêcher la formation des plaques amyloïdes. La vision actuelle propose que les peptides A β soient toxiques avant leur agrégation en modulant de façon délétère la transmission synaptique impliquée dans la formation des souvenirs (Walsh and Selkoe, 2007). Afin de mieux comprendre la physiologie et la toxicité d'A β sur la mémoire, nous avons développé deux stratégies : 1) nous avons surexprimé la β -sécrétase dans les CPs de mouches adultes afin de favoriser la voie amyloïdogénique, et 2) nous avons étudié directement l'effet de la surexpression de peptides amyloïdes dans les CPs chez le jeune adulte.

De manière étonnante nous avons observé que la surexpression de dBACE dans les CPs de mouches adultes n'est pas délétère pour la STM. De la même manière, l'induction de l'expression de dA β dans les CPs de mouches adultes n'altère pas la STM.

Jusqu'alors, les études menées *in vivo* reposaient toutes sur la surproduction constitutive d'A β . L'expression constitutive de peptides A β humains dans le système nerveux de la mouche induit une déposition amyloïde, qui est suivie d'une neurodégénérescence corrélée à l'apparition de déficits liés à l'âge dans un paradigme de mémoire associative olfactive similaire à celui de notre étude (Iijima et al., 2004). De plus, les auteurs ont montré que l'effet toxique des peptides amyloïdes est corrélé à leur propension à s'agréger. Dans notre étude, l'expression pendant 2 j de dA β dans les CPs de drosophiles adultes permet la synthèse d'une grande quantité de peptides, mais n'induit pas de dépôts amyloïdes. En effet, Carmine et al. (2009) n'observèrent pas de lésions chez de jeunes mouches de 1 ou 2 j (environ l'âge des

mouches que nous testons) en surexprimant de façon constitutive dA β sous le contrôle du pilote d'expression *App1-GAL4*. Ainsi chez le jeune adulte, une grande quantité de peptides n'affecte pas les processus neuronaux mis en jeu dans la mémoire. Il serait intéressant d'analyser l'effet sur la mémoire de l'expression d'A β 42 humain ou d'autres formes mutées plus fibrillogènes. Il serait également intéressant d'analyser l'effet de la surexpression transitoire de dBACE ou dA β chez des mouches âgées de 10 ou 25 j pour comprendre si le cerveau vieillissant devient plus sensible à la toxicité d'A β ou si c'est l'exposition chronique aux peptides amyloïdes qui fragilise le fonctionnement cérébral.

Nous avons ensuite étudié l'effet de la surexpression de dBACE et celle de dA β dans un contexte limitant en APPL. La surexpression transitoire de dBACE ou de dA β dans les CPs d'hétérozygotes *App1^d/+ ; MBSw/+* induisent le même phénotype, c'est à dire l'exacerbation du défaut de STM causé par la perte partielle d'APPL. Ces résultats suggèrent un mécanisme commun, c'est-à-dire que l'effet délétère de dBACE résulte de la surproduction de dA β . De façon cohérente, Carmine-Simmen et al. (2009) ont démontré que la surproduction conjointe de dBACE et d'APPL sous contrôle du pilote d'expression *App1-GAL4* produit le même type de lésions cérébrales (dépôts réactifs à ThioflavineS et présence de vacuoles) que la coexpression de dA β et d'APPL, suggérant que moduler l'expression de la β -sécrétase, ou celle de dA β génère le même effet.

Puisque ni la surexpression de dBACE, ni celle de dA β n'est toxique en contexte sauvage, l'effet délétère observé dans un contexte limitant en APPL semble lié à APPL. Or, la quantité de dA β produite par la surexpression de dBACE dans un contexte sauvage est très probablement plus élevée que dans un contexte où la quantité de son substrat APPL est réduite de 60 %. Ainsi, l'on peut considérer que le déficit de mémoire n'est pas, du moins en totalité, causé par un gain de toxicité apporté par les peptides amyloïdes, mais qu'il résulterait d'une combinaison entre cette toxicité et la perte partielle de fonction APPL.

Les peptides dA β que nous surexprimons sont dépourvus de séquence signal. Carmine-Simmen et al. (2009) ont observé que leur surexpression dans les photorécepteurs induit une déposition amyloïde extracellulaire dans la rétine, ce que suggère que ces peptides sont sécrétés. La séquence dA β que nous avons utilisée étant fusionnée à une séquence HA, nous pourrions analyser *in toto* la localisation du signal HA. Si ce signal est concentré au niveau des cellules de Kenyon, il faudrait alors considérer que les effets que nous observons sont dus à un effet toxique intracellulaire. La présence d'A β dans le compartiment intracellulaire est en

effet toxique (LaFerla et al., 1995). De plus, une récente étude propose que ces peptides puissent être transportés au noyau et réguler l'expression de gènes (Barucker et al., 2014).

Nature de l'interaction fonctionnelle dA β /APPL

Greeve et al. (2004) ont montré que la surexpression conjointe d'APP et de BACE1 entraîne une pathologie amyloïde aggravée par la surexpression de PS1 mutée. De façon générale, dans le modèle de la MA, les phénotypes induits par APP sont aggravés par A β , ce qui a toujours été attribué à la seule toxicité d'A β . Il est néanmoins possible qu'une interaction négative entre l'APP en excès et A β n'ait pas été identifiée.

Dans ce sens, plusieurs équipes ont démontré que la toxicité d'A β pourrait être médiée par APP. Sola Vigo et al. (2009) ont rapporté que la surexpression d'APP dans des neurones hippocampiques les rend plus vulnérables à la toxicité d'A β , tandis que Lorenzo et al. (2000) ont montré que des neurones dépourvus d'APP sont moins vulnérables à la toxicité d'A β . Les premiers ont aussi déterminé que l'hypersensibilité des neurones était dépendante de la partie intracellulaire d'APP, et impliquait les Go protéines, suggérant que la toxicité d'A β requiert l'activation par APP de voies en aval (Sola Vigo et al., 2009). Lorenzo et al. (2000), eux, apportaient la preuve par des expériences de co-immunoprécipitation d'un lien direct physique entre les formes fibrillaires d'A β et l'APP membranaire (Lorenzo et al., 2000).

Deux sites d'interaction A β /APP ont été identifiés. L'un au niveau des résidus 105-119, à l'extrémité N-terminale d'APP, l'autre au niveau de la séquence A β elle-même. Shaked et al. (2006) ont montré que le premier site est préférentiellement impliqué dans la liaison d'A β aux formes sécrétées d'APP, tandis que le second permettrait la liaison à l'APP membranaire. La liaison sAPP/A β permet aux peptides amyloïdes de séquestrer sAPP α dans le milieu extracellulaire dans des cultures de cellules, mécanisme par lequel il pourrait l'empêcher d'exercer un effet neuroprotecteur, voire bénéfique pour la mémoire. La liaison A β /APP par la séquence A β facilite l'homodimérisation d'APP. Ces dimères contribuent à l'activation des voies pro-apoptiques dépendantes des caspases via le motif YENPTY (Shaked et al., 2006). Comme on l'a cité plus haut, au contraire, la liaison de sAPP α entraîne la rupture des dimères APP, et empêche l'apoptose. Ainsi, les interactions de sAPP α ou celle d'A β avec leur précurseur APP auraient des effets antagonistes au niveau cellulaire. Ceci est tout à fait en accord avec les interactions fonctionnelles que nous avons mises en évidence entre APPL et ses métabolites en ce qui concerne la formation de la mémoire.

Une récente étude montre qu'A β 40, sous sa forme mono- ou dimérique, se fixe à des dimères d'APP pour permettre le relargage de vésicules synaptiques après l'activation de récepteurs glutamatergiques, et module ainsi la transmission synaptique (Fogel et al., 2014). La plupart des interactions A β /APP décrites jusqu'alors impliquaient des formes fibrillaires d'A β . On peut émettre l'hypothèse selon laquelle les interactions de fibrilles ou d'oligomères A β avec APP sont plus stables que des interactions mettant en jeu des formes monomériques d'A β , c'est pourquoi ces dernières ne seraient que très peu détectées. Selon cette hypothèse, l'on peut envisager que la fixation d'oligomères ou de fibrilles A β à APP entraîne une dérégulation de la transmission excitatrice, et qu'elle altère ainsi la qualité de l'information transmise. La capacité des dimères APP à activer les voies pro-apoptotiques serait alors une sorte de mécanisme protecteur contre l'excitotoxicité. Toutes ces données sont concordantes avec notre observation que dA β requiert une perte de fonction APPL pour altérer la mémoire.

Nous aimerions proposer un modèle selon lequel les dimères APP sont une unité fonctionnelle pour la fonction d'APP dans la transmission synaptique sous-jacent la mémoire, et que cette transmission puisse être modulée positivement par le fragment sécrété α , et négativement par A β lorsqu'il est en excès ou sous forme fibrillaire, jusqu'à devenir neurotoxique.

Conclusion générale

Après de nombreux échecs thérapeutiques, il apparaît aujourd'hui crucial de comprendre la physiologie de la voie APP pour comprendre son rôle dans le développement de la MA. Le modèle d'étude simplifié que constitue la drosophile permet avec un niveau d'analyse sophistiqué qu'est l'étude de la mémoire, premier processus affecté chez les patients atteints de la MA, de poser des questions précises comme par exemple d'étudier la part relative d'un dysfonctionnement d'APP et de l'accumulation d'A β dans la perte mnésique.

Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence deux types d'interactions d'APPL avec ses métabolites sur le plan fonctionnel : une positive entre l'APPL sécrétée et membranaire, une négative entre dA β et APPL. Pour la première fois, nous avons mis en exergue un rôle pour la forme membranaire de la protéine dans la mémoire, ce qui soulève à nouveau la question de savoir si APP agit comme un récepteur transmembranaire comme sa structure l'a initialement suggéré. Nos données montrent que la toxicité de dA β pourrait être en partie médiée par APPL, et suggèrent que de concert un gain de toxicité amyloïde et une perte de fonction APP puissent amplifier le déclin mnésique. Nous proposons que la surproduction des peptides amyloïdes ne soit pas l'évènement initiateur du dysfonctionnement mnésique dans la MA mais qu'elle agirait plutôt comme un aggravateur des déficits induits par la perte de fonction APPL antérieure.

Ces données questionnent les cibles thérapeutiques : si la forme complète d'APP est effectivement un acteur majeur de la fonction mnésique, alors les stratégies qui visent à moduler sa protéolyse peuvent s'avérer inefficaces, et celles qui tendent à diminuer l'agrégation du peptide amyloïde, en augmentant le niveau d'A β circulant, peuvent se révéler délétères.

ANNEXE

Analyse de la voie Wnt-PCP dans la mémoire olfactive chez la drosophile adulte

Au cours de ma thèse, j'ai eu l'occasion d'initier un projet annexe dont je vais présenter quelques résultats dans cette partie. De récents travaux ont démontré qu'APPL était un acteur moléculaire de la voie Wnt-PCP impliquée dans le développement des CPs. Nous avons voulu analyser si cette voie possédait un rôle fonctionnel chez l'adulte dans la mémoire olfactive.

Introduction

Les protéines Wnt (ou Wingless (Wg) chez la drosophile) appartiennent à une famille de glycoprotéines secrétées impliquées dans de multiples processus biologiques tels la prolifération, la différenciation, la migration et la polarisation cellulaires ainsi que l'apoptose et la survie. Les protéines Wnt se fixent aux récepteurs Frizzled (Fz), à 7 domaines transmembranaires qui activent la protéine Dishevelled (Dsh) qui est un carrefour de trois voies de signalisation : 1) la voie canonique Wnt/ β -caténine impliquée dans la régulation transcriptionnelle de gènes cibles, 2) la voie Wnt-PCP (pour Planar Cell Polarity) impliquée dans la migration et la polarisation cellulaire et enfin 3) la voie calcique qui régule la concentration de calcium intracellulaire. Chez la drosophile, les mutants *Wingless*, *Frizzled*, *Dishevelled* sont tous des mutants de développement (Korkut and Budnik, 2009).

Une récente étude a cherché à caractériser le rôle d'APPL dans le développement du système nerveux chez la drosophile, et, à cette occasion, a démontré qu'APPL est un acteur de la voie Wnt-PCP (Soldano et al., 2013). Ils ont démontré qu'APPL était requis pour le développement des CPs et plus particulièrement des neurones α/β : l'étude de mutants *App^l* démontre qu'APPL est requis de manière « cellule autonome » pour la mise en place des lobes β et de façon « cellule non-autonome » pour la fasciculation des axones α en lobes verticaux. La voie PCP a été initialement décrite comme une voie universelle de polarité cellulaire dans les cellules épithéliales (par exemple, chez la drosophile, au niveau la couche épithéliale qui portent les soies), puis dans les neurones, il a été montré qu'elle participe à la régulation de la croissance axonale. Soldano et al. (2013) ont montré qu'APPL peut moduler

l'activation de la voie du PCP par contrôlant la phosphorylation de la protéine Dsh par la kinase Abelson (Abl). Leur étude suggère également que Wnt5 serait un ligand d'APPL, un élément encore en faveur d'un rôle de récepteur pour APPL (Soldano et al., 2013).

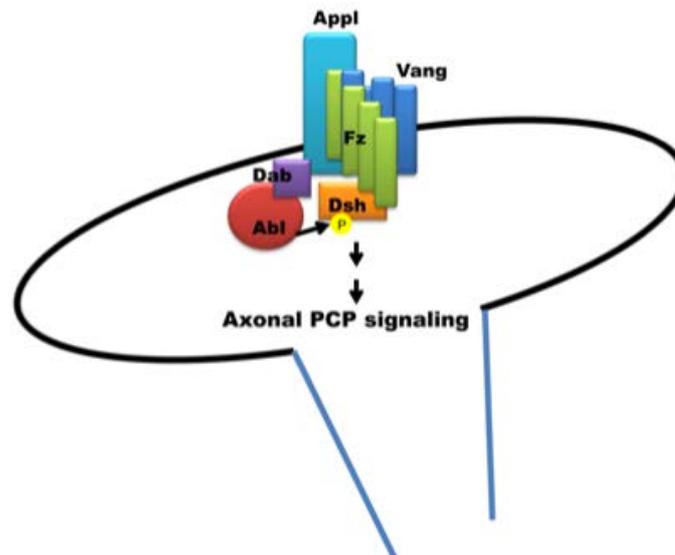


Figure 25. Modèle d'interaction entre APPL et la voie Wnt-PCP pour le développement axonal chez la drosophile.

(Soldano et al.2013)

Jusqu'ici, la signalisation Wnt avait été associée à la MA principalement via la voie Wnt/ β -caténine (Moon et al., 2004). Notamment, la voie canonique Wnt contrôle l'activité de kinase GSK3 β et l'inhibition de GSK3 β prévient l'hyperphosphorylation de tau (Sperber et al., 1995). D'autre part, APP modulerait la dégradation de la β -caténine (Chen and Bodles, 2007). Ces données montrent l'implication d'une inhibition de la signalisation Wnt dans la MA, qui pourrait aussi bien inclure la voie canonique que les voies non-canoniques (Inestrosa and Varela-Nallar, 2014).

Résultats

Nous avons voulu analyser si la voie Wnt-PCP pouvait jouer chez la drosophile adulte un rôle fonctionnel dans la mémoire olfactive. Puisque Soldano et al. montraient qu'APPL régule l'activité de la kinase Abelson, nous avons dans un premier temps moduler l'activité de la kinase Abelson dans les CPs adultes (Figure 25). Pour cela, nous avons soit surexprimé la séquence Abl (Figure 27A), soit exprimé une séquence ARNi dirigée contre Abl ; nous avons

utilisé deux ARNi distincts et non-chevauchant (Figure 26B-C). Nous n'avons observé dans aucun des trois cas une altération ou une augmentation de la STM. Après 48 h d'induction sur milieu contenant du RU, les performances des mouches *MBSw/Abl* testées 2 h après 1 cycle de conditionnement étaient similaires à celles de leurs contrôles génétiques ($F_{(2,23)}$, $p = 0.0712$, $n = 8$), tout comme celles des mouches *MBSw/ARNi-Abl 110186* ($F_{(2,23)}$, $*p < 0.05$, $n = 8$; post-hoc tests *MBSw/ARNi Abl 110186* vs *MBSw/+* ou *+/ARNi Abl 110186*, $p > 0.05$) et *MBSw/ARNi-Abl 2897* ($F_{(2,33)}$, $p = 0.0544$, $n \geq 11$). Ces résultats indiquent que dans un contexte sauvage, moduler l'activité de la kinase Abl n'affecte pas la mémoire à 2 h.

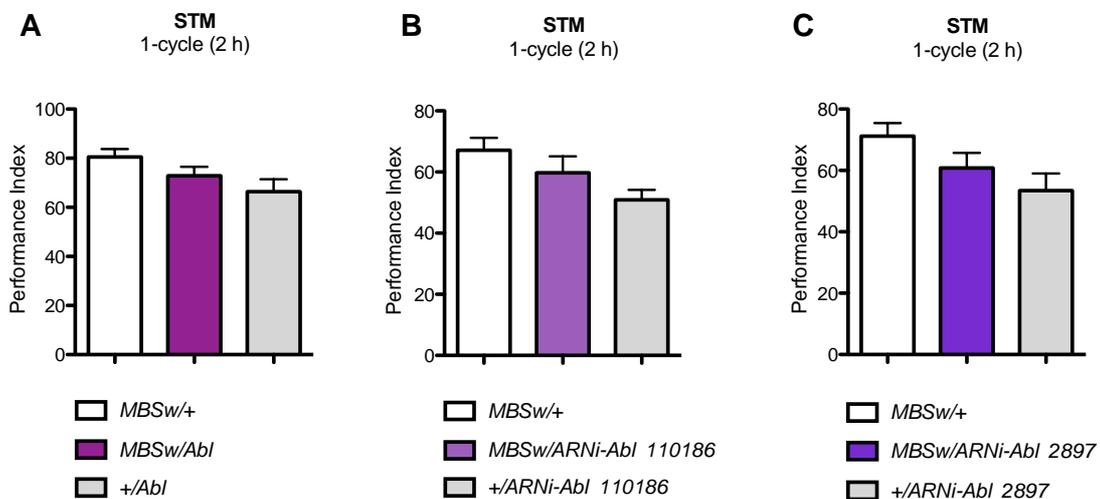


Figure 26. Moduler l'activité de Abelson dans les CPs adultes de mouches sauvages n'affecte pas la STM.

Les histogrammes représentent la moyenne des index de performance \pm SEM.

Au cours de ma thèse, nous avons pu révéler plusieurs interactions fonctionnelles impliquant APPL en se plaçant dans un contexte génétique limitant pour APPL. Nous avons donc appliqué la même stratégie et analysé l'effet de modulation de l'activité d'Abl chez des hétérozygotes *Appl^d/+* (Figure 27).

Les performances des mouches hétérozygotes *Appl^d/+ ;MBSw/Abl* testées 2 j après induction et 2 h après un cycle de conditionnement sont similaires à celles de leurs contrôles (Figure 26A, $F_{(2,51)}$, $**p < 0.005$, $n \geq 15$; post hoc test *Appl^d/+ ;MBSw/Abl* vs *Appl^d/+ ;MBSw/+*, $p > 0.05$) suggérant qu'augmenter l'activité d'Abl n'affecte pas la STM dans ce contexte. En revanche si l'inhibition de l'expression d'Abl par le ARNi 110186 ne modifie pas non plus la mémoire à 2 h (Figure 26B, $F_{(2,20)}$, $p > 0.05$, $n + 7$), l'expression du

ARNi 2897 affecte la STM. Les performances des mouches *App1^d/+ ;MBSw/ARNi-Abl 2897* sont diminuées par rapport à celles des hétérozygotes *App1^d/+ ;MBSw/+* et des *+/ARNi-Abl 2897* (Figure 26C, $F_{(2,45)}$, * $p < 0.05$, $n \geq 12$). Anise, l'inhibition de l'expression d'Abl pourrait par le ARNi 2897 suggère une interaction fonctionnelle entre Abl et APPL pour la mémoire.

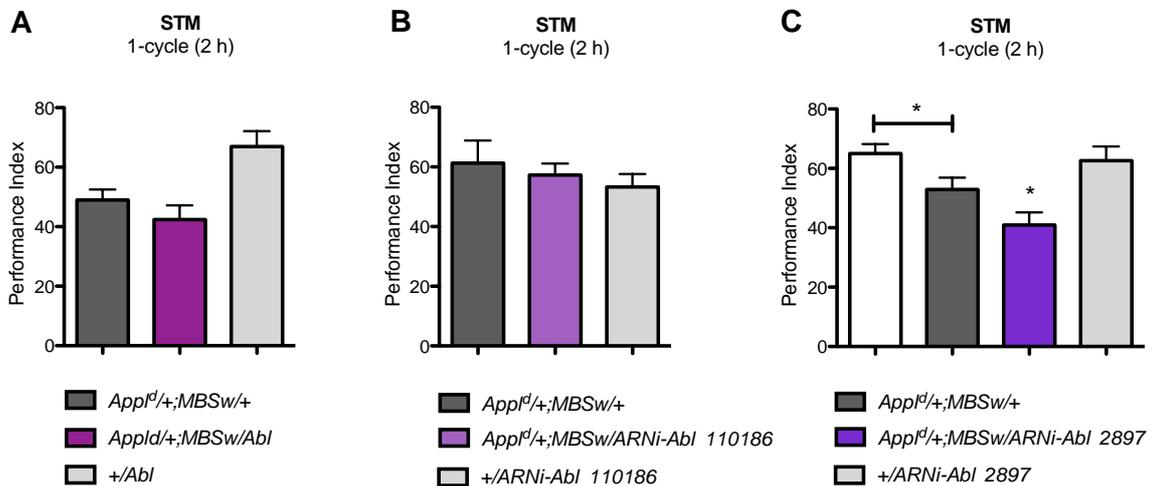


Figure 27. Inhiber l'expression de Abelson dans les CPs adultes d'hétérozygotes *App1^d* affecte la STM.

Les histogrammes représentent la moyenne des index de performance \pm SEM.

Pour conclure sur l'effet d'une inhibition d'expression sur la mémoire, il est requis d'observer le même phénotype avec deux séquences ARNi distinctes et non chevauchantes afin de se départir d'éventuels gènes cibles non-spécifiques de ces ARNi, c'est pourquoi nous avons ici utilisé deux ARNi. Le fait que nous ne retrouvons pas le défaut de STM avec les deux ARNi distincts peut être donc s'expliquer par deux hypothèses : 1) l'effet du ARNi 2897 est dû à un autre gène cible, ou bien 2) le ARNi inhibe l'expression d'Abl plus « efficacement » que le ARNi 110186. Pour tester cette hypothèse, nous avons mesuré la quantité d'ARNm Abl à partir de têtes de mouches exprimant l'un ou l'autre ARNi sous contrôle du pilote d'expression *elav* et non l'avons comparée à des mouches *elav/+*. Nous avons quantifié une diminution de 32% du niveau d'expression chez les mouches *elav/ARNi Abl 110186* et nous n'avons pas été en mesure de détecter de diminution de l'expression d'Abl chez les mouches *elav/ARNi Abl 2897*. L'ARNi 2897 possède un gène cible non-spécifique ou « off-target » nommé *Regulator of Gene Activity (Rga)* qui contrôle notamment l'expression du gène *white*, ce qui suggère que le phénotype que nous avons observé pourrait ne pas être spécifique de l'activité kinase d'Abelson.

Nous avons cependant analysé l'impact sur la mémoire de la modulation de l'activité de Dsh, qui agit en aval de Abl dans la voie Wnt-PCP, chez des hétérozygotes *Appl^d* (Figure 28). Les performances des mouches *Appl^d/+ ;MBSw/Dsh* testées 2 h après un cycle de conditionnement étaient similaires à celles de leurs contrôles (Figure 28A, $F_{(2,50)}$, $*p < 0.05$, $n \geq 15$; post hoc test *Appl^d/+ ;MBSw/Dsh* vs *Appl^d/+ ;+/Dsh*, $p > 0.05$) tout comme celles des *Appl^d/+ ;MBSw/ARNi Dsh* (Figure 28B, $F_{(2,19)}$, $p > 0.05$, $n \geq 6$), ce qui suggère que Dsh n'est pas impliquée dans la mise en place mémoire à 2 h.

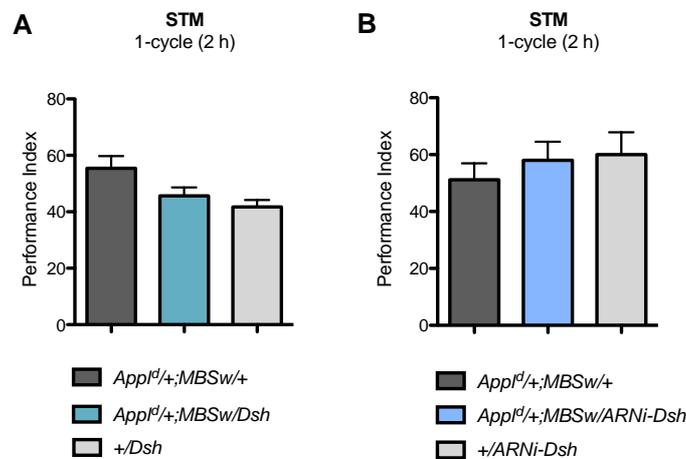


Figure 28. Moduler l'activité de Dishevelled dans les CPs adultes n'affecte pas la STM.

Les histogrammes représentent la moyenne des index de performance \pm SEM.

Conclusion

L'initiation de ce projet nous a tout d'abord fait penser qu'il existerait une interaction entre la voie Wnt-PCP chez l'adulte dans la mémoire à court-terme puis les données que nous avons continué à produire n'ont pas permis d'obtenir une conclusion claire quant à l'implication de la voie Abl-Dsh dans la mémoire olfactive. Il serait intéressant de poursuivre le projet, et notamment de tester si Wnt5, décrit comme un ligand d'APPL dans cette voie PCP par Soldano et al. pourrait participer à la fonction d'APPL dans la mémoire, même si c'est indépendamment de la voie Wnt-PCP.

BIBLIOGRAPHIE

- Acquati F, Accarino M, Nucci C, Fumagalli P, Jovine L, Ottolenghi S, Taramelli R (2000) The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region. *FEBS Lett* 468:59–64.
- Adams MD et al. (2000) The genome sequence of *Drosophila melanogaster*. *Science* 287:2185–2195.
- Allinson TMJ, Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM (2003) ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases. *J Neurosci* 23:342–352.
- Almkvist O, Basun H, Wagner SL, Rowe BA, Wahlund LO, Lannfelt L (1997) Cerebrospinal fluid levels of alpha-secretase-cleaved soluble amyloid precursor protein mirror cognition in a Swedish family with Alzheimer disease and a gene mutation. *Arch Neurol* 54:641–644.
- Alves da Costa C, Sunyach C, Pardossi-Piquard R, Sévalle J, Vincent B, Boyer N, Kawarai T, Girardot N, St George-Hyslop P, Checler F (2006) Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 26:6377–6385.
- Alzheimer A (1907) Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allg Z Psychiatr Psych-Gerichtl Med* 64:146–148.
- Amrein H, Thorne N (2005) Gustatory perception and behavior in *Drosophila melanogaster*. *Curr Biol CB* 15:R673–R684.
- Anderson JP, Chen Y, Kim KS, Robakis NK (1992) An alternative secretase cleavage produces soluble Alzheimer amyloid precursor protein containing a potentially amyloidogenic sequence. *J Neurochem* 59:2328–2331.
- Anliker B, Müller U (2006) The functions of mammalian amyloid precursor protein and related amyloid precursor-like proteins. *Neurodegener Dis* 3:239–246.
- Arriagada PV, Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631–639.
- Asai M, Hattori C, Szabó B, Sasagawa N, Maruyama K, Tanuma S, Ishiura S (2003) Putative function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP -secretase. *Biochem Biophys Res Commun* 301:231–235.
- Ashley J, Packard M, Ataman B, Budnik V (2005) Fasciclin II signals new synapse formation through amyloid precursor protein and the scaffolding protein dX11/Mint. *J Neurosci* 25:5943–5955.
- Back S, Haas P, Tschäpe J-A, Gruebl T, Kirsch J, Müller U, Beyreuther K, Kins S (2007) beta-amyloid precursor protein can be transported independent of any sorting signal to the axonal and dendritic compartment. *J Neurosci Res* 85:2580–2590.

- Barucker C, Harmeier A, Weiske J, Fauler B, Albring KF, Prokop S, Hildebrand P, Lurz R, Heppner FL, Huber O, Multhaup G (2014) Nuclear Translocation uncovers the Amyloid Peptide Abeta42 as a Regulator of Gene Transcription. *J Biol Chem*.
- Baumkötter F, Wagner K, Eggert S, Wild K, Kins S (2012) Structural aspects and physiological consequences of APP/APLP trans-dimerization. *Exp Brain Res* 217:389–395.
- Beckett C, Nalivaeva NN, Belyaev ND, Turner AJ (2012) Nuclear signalling by membrane protein intracellular domains: The AICD enigma. *Cell Signal* 24:402–409.
- Beher D, Hesse L, Masters CL, Multhaup G (1996) Regulation of amyloid protein precursor (APP) binding to collagen and mapping of the binding sites on APP and collagen type I. *J Biol Chem* 271:1613–1620.
- Bernards A, Hariharan IK (2001) Of flies and men--studying human disease in *Drosophila*. *Curr Opin Genet Dev* 11:274–278.
- Bertram L, McQueen MB, Mullin K, Blacker D, Tanzi RE (2007) Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat Genet* 39:17–23.
- Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9–23.
- Bilen J, Bonini NM (2005) *Drosophila* as a model for human neurodegenerative disease. *Annu Rev Genet* 39:153–171.
- Billings LM, Oddo S, Green KN, McGaugh JL, LaFerla FM (2005) Intraneuronal Abeta causes the onset of early Alzheimer's disease-related cognitive deficits in transgenic mice. *Neuron* 45:675–688.
- Bolkan BJ, Triphan T, Kretschmar D (2012) β -Secretase Cleavage of the Fly Amyloid Precursor Protein Is Required for Glial Survival. *J Neurosci* 32:16181–16192.
- Borchelt DR et al. (1996) Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron* 17:1005–1013.
- Boulianne GL, Livne-Bar I, Humphreys JM, Liang Y, Lin C, Rogaev E, St George-Hyslop P (1997) Cloning and characterization of the *Drosophila* presenilin homologue. *Neuroreport* 8:1025–1029.
- Bour A, Little S, Dodart JC, Kelche C, Mathis C (2004) A secreted form of the beta-amyloid precursor protein (sAPP695) improves spatial recognition memory in OF1 mice. *Neurobiol Learn Mem* 81:27–38.
- Braak H, Braak E (1991) Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol (Berl)* 82:239–259.
- Braak H, Braak E (1997) Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 18:S85–S88.
- Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–415.

- Brookmeyer R, Corrada MM, Curriero FC, Kawas C (2002) Survival following a diagnosis of Alzheimer disease. *Arch Neurol* 59:1764–1767.
- Buckner RL (2004) Memory and executive function in aging and AD: multiple factors that cause decline and reserve factors that compensate. *Neuron* 44:195–208.
- Burdick D, Soreghan B, Kwon M, Kosmoski J, Knauer M, Henschen A, Yates J, Cotman C, Glabe C (1992) Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem* 267:546–554.
- Bushey D, Cirelli C (2011) From genetics to structure to function: exploring sleep in *Drosophila*. *Int Rev Neurobiol* 99:213–244.
- Byers D, Davis RL, Kiger JA (1981) Defect in cyclic AMP phosphodiesterase due to the dunce mutation of learning in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 289:79–81.
- Callaway E (2012) Alzheimer's drugs take a new tack. *Nature* 489:13–14.
- Campion D, Dumanchin C, Hannequin D, Dubois B, Belliard S, Puel M, Thomas-Anterion C, Michon A, Martin C, Charbonnier F, Raux G, Camuzat A, Penet C, Mesnage V, Martinez M, Clerget-Darpoux F, Brice A, Frebourg T (1999) Early-onset autosomal dominant Alzheimer disease: prevalence, genetic heterogeneity, and mutation spectrum. *Am J Hum Genet* 65:664–670.
- Canepa E, Domenicotti C, Marengo B, Passalacqua M, Marinari UM, Pronzato MA, Fedele E, Ricciarelli R (2013) Cyclic adenosine monophosphate as an endogenous modulator of the amyloid- β precursor protein metabolism. *IUBMB Life* 65:127–133.
- Cao W, Song H-J, Gangi T, Kelkar A, Antani I, Garza D, Konsolaki M (2008) Identification of novel genes that modify phenotypes induced by Alzheimer's beta-amyloid overexpression in *Drosophila*. *Genetics* 178:1457–1471.
- Cao X, Südhof TC (2004) Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* 279:24601–24611.
- Carmine-Simmen K, Proctor T, Tschäpe J, Poeck B, Triphan T, Strauss R, Kretzschmar D (2009) Neurotoxic effects induced by the *Drosophila* amyloid- β peptide suggest a conserved toxic function. *Neurobiol Dis* 33:274–281.
- Cash DM et al. (2013) The pattern of atrophy in familial Alzheimer disease: volumetric MRI results from the DIAN study. *Neurology* 81:1425–1433.
- Castellani RJ, Rolston RK, Smith MA (2010) Alzheimer disease. *Dis--Mon DM* 56:484–546.
- Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, Goate A, Rossor M, Roques P, Hardy J (1991) Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 353:844–846.
- Chen Y, Bodles AM (2007) Amyloid precursor protein modulates beta-catenin degradation. *J Neuroinflammation* 4:29.
- Citron M et al. (1997) Mutant presenilins of Alzheimer's disease increase production of 42-residue amyloid beta-protein in both transfected cells and transgenic mice. *Nat Med*

3:67–72.

- Citron M (2004) Strategies for disease modification in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci* 5:677–685.
- Cochran E, Bacci B, Chen Y, Patton A, Gambetti P, Autilio-Gambetti L (1991) Amyloid precursor protein and ubiquitin immunoreactivity in dystrophic axons is not unique to Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 139:485–489.
- Cohen AD, Klunk WE (2014) Early detection of Alzheimer's disease using PiB and FDG PET. *Neurobiol Dis.*
- Connolly JB, Roberts IJ, Armstrong JD, Kaiser K, Forte M, Tully T, O'Kane CJ (1996) Associative learning disrupted by impaired Gs signaling in *Drosophila* mushroom bodies. *Science* 274:2104–2107.
- Copanaki E, Chang S, Vlachos A, Tschäpe J-A, Müller UC, Kögel D, Deller T (2010) sAPP α antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Mol Cell Neurosci* 44:386–393.
- Corrigan F, Pham CLL, Vink R, Blumbergs PC, Masters CL, van den Heuvel C, Cappai R (2011) The neuroprotective domains of the amyloid precursor protein, in traumatic brain injury, are located in the two growth factor domains. *Brain Res* 1378:137–143.
- Coyle JT, Price DL, DeLong MR (1983) Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 219:1184–1190.
- Crespo-Biel N, Theunis C, Van Leuven F (2012) Protein Tau: Prime Cause of Synaptic and Neuronal Degeneration in Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimer's Dis* 2012:e251426.
- Crittenden JR, Skoulakis EM, Han KA, Kalderon D, Davis RL (1998) Tripartite mushroom body architecture revealed by antigenic markers. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 5:38–51.
- Crowther DC, Kinghorn KJ, Miranda E, Page R, Curry JA, Duthie FAI, Gubb DC, Lomas DA (2005) Intraneuronal A β , non-amyloid aggregates and neurodegeneration in a *Drosophila* model of Alzheimer's disease. *Neuroscience* 132:123–135.
- Crowther RA (1991) Straight and paired helical filaments in Alzheimer disease have a common structural unit. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88:2288–2292.
- Dahanukar A, Ray A (2011) Courtship, aggression and avoidance: pheromones, receptors and neurons for social behaviors in *Drosophila*. *Fly (Austin)* 5:58–63.
- Dahms SO, Hoefgen S, Roeser D, Schlott B, Gührs K-H, Than ME (2010) Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:5381–5386.
- Daigle I, Li C (1993) *apl-1*, a *Caenorhabditis elegans* gene encoding a protein related to the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:12045–12049.
- Davis RL (2005) Olfactory memory formation in *Drosophila*: from molecular to systems neuroscience. *Annu Rev Neurosci* 28:275–302.

- Dawkins E, Small DH (2014) Insights into the physiological function of the β -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem*:n/a – n/a.
- Dawson GR, Seabrook GR, Zheng H, Smith DW, Graham S, O'Dowd G, Bowery BJ, Boyce S, Trumbauer ME, Chen HY, Van der Ploeg LH, Sirinathsinghji DJ (1999) Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience* 90:1–13.
- Delaère P, He Y, Fayet G, Duyckaerts C, Hauw JJ (1993) Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiol Aging* 14:191–194.
- De Strooper B, Craessaerts K, Dewachter I, Moechars D, Greenberg B, Van Leuven F, Van den Bergh H (1995) Basolateral secretion of amyloid precursor protein in Madin-Darby canine kidney cells is disturbed by alterations of intracellular pH and by introducing a mutation associated with familial Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 270:4058–4065.
- De Vos KJ, Grierson AJ, Ackerley S, Miller CCJ (2008) Role of axonal transport in neurodegenerative diseases. *Annu Rev Neurosci* 31:151–173.
- Dickerson BC, Sperling RA (2009) Large-scale functional brain network abnormalities in Alzheimer's disease: insights from functional neuroimaging. *Behav Neurol* 21:63–75.
- Didelot G, Molinari F, Tchénio P, Comas D, Milhiet E, Munnich A, Colleaux L, Preat T (2006) Tequila, a neurotrypsin ortholog, regulates long-term memory formation in *Drosophila*. *Science* 313:851–853.
- Di Fede G et al. (2009) A recessive mutation in the APP gene with dominant-negative effect on amyloidogenesis. *Science* 323:1473–1477.
- Dodart J-C, Bales KR, Gannon KS, Greene SJ, DeMattos RB, Mathis C, DeLong CA, Wu S, Wu X, Holtzman DM, Paul SM (2002) Immunization reverses memory deficits without reducing brain A β burden in Alzheimer's disease model. *Nat Neurosci* 5:452–457.
- Drain P, Folkers E, Quinn WG (1991) cAMP-dependent protein kinase and the disruption of learning in transgenic flies. *Neuron* 6:71–82.
- Dubnau J, Chiang A-S, Grady L, Barditch J, Gossweiler S, McNeil J, Smith P, Buldoc F, Scott R, Certa U, Broger C, Tully T (2003) The *staufen/pumilio* pathway is involved in *Drosophila* long-term memory. *Curr Biol* 13:286–296.
- Dubnau J, Tully T (1998) Gene discovery in *Drosophila*: new insights for learning and memory. *Annu Rev Neurosci* 21:407–444.
- Dudai Y, Jan YN, Byers D, Quinn WG, Benzer S (1976) *dunce*, a mutant of *Drosophila* deficient in learning. *Proc Natl Acad Sci U S A* 73:1684–1688.
- Duerr JS, Quinn WG (1982) Three *Drosophila* mutations that block associative learning also affect habituation and sensitization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 79:3646–3650.
- Duff K, Eckman C, Zehr C, Yu X, Prada CM, Perez-tur J, Hutton M, Buee L, Harigaya Y,

- Yager D, Morgan D, Gordon MN, Holcomb L, Refolo L, Zenk B, Hardy J, Younkin S (1996) Increased amyloid-beta₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* 383:710–713.
- Dulin F, L veill  F, Ortega JB, Mornon J-P, Buisson A, Callebaut I, Colloc'h N (2008) P3 peptide, a truncated form of A beta devoid of synaptotoxic effect, does not assemble into soluble oligomers. *FEBS Lett* 582:1865–1870.
- Duyckaerts C, Hauw JJ (1997) Diagnosis and staging of Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 18:S33–S42.
- Duyckaerts C, Potier M-C, Delatour B (2007) Alzheimer disease models and human neuropathology: similarities and differences. *Acta Neuropathol (Berl)* 115:5–38.
- Engels WR, Johnson-Schlitz DM, Eggleston WB, Sved J (1990) High-frequency P element loss in *Drosophila* is homolog dependent. *Cell* 62:515–525.
- Epis R, Marcello E, Gardoni F, Vastagh C, Malinverno M, Balducci C, Colombo A, Borroni B, Vara H, Dell'Agli M, Cattabeni F, Giustetto M, Borsello T, Forloni G, Padovani A, Di Luca M (2010) Blocking ADAM10 synaptic trafficking generates a model of sporadic Alzheimer's disease. *Brain J Neurol* 133:3323–3335.
- Fahrenholz F (2007) Alpha-secretase as a therapeutic target. *Curr Alzheimer Res* 4:412–417.
- Farzan M, Schnitzler CE, Vasilieva N, Leung D, Choe H (2000) BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9712–9717.
- Fellgiebel A, Kojro E, M ller MJ, Scheurich A, Schmidt LG, Fahrenholz F (2009) CSF APPs alpha and phosphorylated tau protein levels in mild cognitive impairment and dementia of Alzheimer's type. *J Geriatr Psychiatry Neurol* 22:3–9.
- Ferris J, Ge H, Liu L, Roman G (2006) G(o) signaling is required for *Drosophila* associative learning. *Nat Neurosci* 9:1036–1040.
- Finelli A, Kelkar A, Song H-J, Yang H, Konsolaki M (2004) A model for studying Alzheimer's Abeta₄₂-induced toxicity in *Drosophila melanogaster*. *Mol Cell Neurosci* 26:365–375.
- Fogel H, Frere S, Segev O, Bharill S, Shapira I, Gazit N, O'Malley T, Slomowitz E, Berdichevsky Y, Walsh DM, Isacoff EY, Hirsch JA, Slutsky I (2014) APP Homodimers Transduce an Amyloid- β -Mediated Increase in Release Probability at Excitatory Synapses. *Cell Rep* 7:1560–1576.
- Folkers E, Drain P, Quinn WG (1993) Radish, a *Drosophila* mutant deficient in consolidated memory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8123–8127.
- Folstein MF, Folstein SE, McHugh PR (1975) "Mini-mental state". A practical method for grading the cognitive state of patients for the clinician. *J Psychiatr Res* 12:189–198.
- Förstl H, Kurz A (1999) Clinical features of Alzheimer's disease. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 249:288–290.
- Francis R et al. (2002) aph-1 and pen-2 are required for Notch pathway signaling, gamma-

- secretase cleavage of betaAPP, and presenilin protein accumulation. *Dev Cell* 3:85–97.
- Fulga TA, Elson-Schwab I, Khurana V, Steinhilb ML, Spires TL, Hyman BT, Feany MB (2007) Abnormal bundling and accumulation of F-actin mediates tau-induced neuronal degeneration in vivo. *Nat Cell Biol* 9:139–148.
- Furukawa K, Sopher BL, Rydel RE, Begley JG, Pham DG, Martin GM, Fox M, Mattson MP (1996) Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *J Neurochem* 67:1882–1896.
- Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, Carr T, Clemens J, Donaldson T, Gillespie F (1995) Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 373:523–527.
- Gandy S, Greengard P (1994) Regulated cleavage of the Alzheimer amyloid precursor protein: molecular and cellular basis. *Biochimie* 76:300–303.
- Gao Q, Yuan B, Chess A (2000) Convergent projections of *Drosophila* olfactory neurons to specific glomeruli in the antennal lobe. *Nat Neurosci* 3:780–785.
- Garcia-Alloza M, Robbins EM, Zhang-Nunes SX, Purcell SM, Betensky RA, Raju S, Prada C, Greenberg SM, Bacskai BJ, Frosch MP (2006) Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol Dis* 24:516–524.
- Gervasi N, Tchénio P, Preat T (2010) PKA dynamics in a *Drosophila* learning center: coincidence detection by rutabaga adenylyl cyclase and spatial regulation by dunce phosphodiesterase. *Neuron* 65:516–529.
- Ge X, Hannan F, Xie Z, Feng C, Tully T, Zhou H, Xie Z, Zhong Y (2004) Notch signaling in *Drosophila* long-term memory formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:10172–10176.
- Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussièrè T, Bouras C, Kövari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer’s disease. *Neurology* 60:1495–1500.
- Glenner GG, Wong CW (1984) Alzheimer’s disease and Down’s syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein. *Biochem Biophys Res Commun* 122:1131–1135.
- Goate A, Chartier-Harlin MC, Mullan M, Brown J, Crawford F, Fidani L, Giuffra L, Haynes A, Irving N, James L (1991) Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer’s disease. *Nature* 349:704–706.
- Goguel V, Belair A-L, Ayaz D, Lampin-Saint-Amaux A, Scaplehorn N, Hassan BA, Preat T (2011) *Drosophila* Amyloid Precursor Protein-Like Is Required for Long-Term Memory. *J Neurosci* 31:1032–1037.
- Goldgaber D, Lerman MI, McBride OW, Saffiotti U, Gajdusek DC (1987) Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer’s disease. *Science* 235:877–880.

- Goodger ZV, Rajendran L, Trutzel A, Kohli BM, Nitsch RM, Konietzko U (2009) Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J Cell Sci* 122:3703–3714.
- Götz J, Ittner LM (2008) Animal models of Alzheimer’s disease and frontotemporal dementia. *Nat Rev Neurosci* 9:532–544.
- Graeber MB, Kösel S, Grasbon-Frodl E, Möller HJ, Mehraein P (1998) Histopathology and APOE genotype of the first Alzheimer disease patient, Auguste D. *Neurogenetics* 1:223–228.
- Gralle M, Botelho MG, Wouters FS (2009) Neuroprotective Secreted Amyloid Precursor Protein Acts by Disrupting Amyloid Precursor Protein Dimers. *J Biol Chem* 284:15016–15025.
- Gralle M, Oliveira CLP, Guerreiro LH, McKinstry WJ, Galatis D, Masters CL, Cappai R, Parker MW, Ramos CHI, Torriani I, Ferreira ST (2006) Solution conformation and heparin-induced dimerization of the full-length extracellular domain of the human amyloid precursor protein. *J Mol Biol* 357:493–508.
- Greenspan RJ, Dierick HA (2004) “Am not I a fly like thee?” From genes in fruit flies to behavior in humans. *Hum Mol Genet* 13 Spec No 2:R267–R273.
- Greeve I, Kretzschmar D, Tschäpe J-A, Beyn A, Brellinger C, Schweizer M, Nitsch RM, Reifegerste R (2004) Age-dependent neurodegeneration and Alzheimer-amyloid plaque formation in transgenic *Drosophila*. *J Neurosci* 24:3899–3906.
- Griffith LC, Ejima A (2009) Courtship learning in *Drosophila melanogaster*: diverse plasticity of a reproductive behavior. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 16:743–750.
- Griffith LS, Mathes M, Schmitz B (1995) Beta-amyloid precursor protein is modified with O-linked N-acetylglucosamine. *J Neurosci Res* 41:270–278.
- Guérin D, Sacquet J, Mandairon N, Jourdan F, Didier A (2009) Early locus coeruleus degeneration and olfactory dysfunctions in Tg2576 mice. *Neurobiol Aging* 30:272–283.
- Guillén A, Jallon JM, Fehrentz JA, Pantaloni C, Bockaert J, Homburger V (1990) A Go-like protein in *Drosophila melanogaster* and its expression in memory mutants. *EMBO J* 9:1449–1455.
- Gunawardena S, Goldstein LS (2001) Disruption of axonal transport and neuronal viability by amyloid precursor protein mutations in *Drosophila*. *Neuron* 32:389–401.
- Guo M, Hong EJ, Fernandes J, Zipursky SL, Hay BA (2003) A reporter for amyloid precursor protein gamma-secretase activity in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 12:2669–2678.
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Oltersdorf T, Teplow DB, Selkoe DJ (1993) Normal cellular processing of the beta-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid beta peptide and related molecules. *Ann N Y Acad Sci* 695:109–116.
- Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270–a006270.

- Haass C, Koo EH, Capell A, Teplow DB, Selkoe DJ (1995) Polarized sorting of beta-amyloid precursor protein and its proteolytic products in MDCK cells is regulated by two independent signals. *J Cell Biol* 128:537–547.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB (1992) Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359:322–325.
- Hamid R, Kilger E, Willem M, Vassallo N, Kostka M, Bornhövd C, Reichert AS, Kretzschmar HA, Haass C, Herms J (2007) Amyloid precursor protein intracellular domain modulates cellular calcium homeostasis and ATP content. *J Neurochem* 102:1264–1275.
- Han W, Ji T, Mei B, Su J (2011) Peptide p3 may play a neuroprotective role in the brain. *Med Hypotheses* 76:543–546.
- Harbison ST, Mackay TFC, Anholt RRH (2009) Understanding the neurogenetics of sleep: progress from *Drosophila*. *Trends Genet TIG* 25:262–269.
- Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256:184–185.
- Hardy J, Selkoe DJ (2002) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297:353–356.
- Hashimoto Y, Tsuji O, Niikura T, Yamagishi Y, Ishizaka M, Kawasumi M, Chiba T, Kanekura K, Yamada M, Tsukamoto E, Kouyama K, Terashita K, Aiso S, Lin A, Nishimoto I (2003) Involvement of c-Jun N-terminal kinase in amyloid precursor protein-mediated neuronal cell death. *J Neurochem* 84:864–877.
- Hauw JJ, Vignolo P, Duyckaerts C, Beck H, Forette F, Henry JF, Laurent M, Piette F, Sachet A, Berthaux P (1986) [Neuropathological study of 12 centenarians: the incidence of Alzheimer type senile dementia is not particularly increased in this group of very old patients]. *Rev Neurol (Paris)* 142:107–115.
- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rüllicke T, Kretzschmar H, Koch C von, Sisodia S, Tremml P, Lipp H-P, Wolfner DP, Müller U (2000) Mice with Combined Gene Knock-Outs Reveal Essential and Partially Redundant Functions of Amyloid Precursor Protein Family Members. *J Neurosci* 20:7951–7963.
- Heisenberg M (1998) What do the mushroom bodies do for the insect brain ? An introduction. *Learn Mem* 5:1–10.
- Heisenberg M (2003) Mushroom body memoir: from maps to models. *Nat Rev Neurosci* 4:266–275.
- Heisenberg M, Borst A, Wagner S, Byers D (1985) *Drosophila* mushroom body mutants are deficient in olfactory learning. *J Neurogenet* 2:1–30.
- Herms J, Anliker B, Heber S, Ring S, Fuhrmann M, Kretzschmar H, Sisodia S, Müller U (2004) Cortical dysplasia resembling human type 2 lissencephaly in mice lacking all three APP family members. *EMBO J* 23:4106–4115.
- Herzig MC, Winkler DT, Burgermeister P, Pfeifer M, Kohler E, Schmidt SD, Danner S,

- Abramowski D, Stürchler-Pierrat C, Bürki K, van Duinen SG, Maat-Schieman MLC, Staufenbiel M, Mathews PM, Jucker M (2004) Abeta is targeted to the vasculature in a mouse model of hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis. *Nat Neurosci* 7:954–960.
- Hirth F (2010) *Drosophila melanogaster* in the study of human neurodegeneration. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 9:504–523.
- Holcomb L, Gordon MN, McGowan E, Yu X, Benkovic S, Jantzen P, Wright K, Saad I, Mueller R, Morgan D, Sanders S, Zehr C, O'Campo K, Hardy J, Prada CM, Eckman C, Younkin S, Hsiao K, Duff K (1998) Accelerated Alzheimer-type phenotype in transgenic mice carrying both mutant amyloid precursor protein and presenilin 1 transgenes. *Nat Med* 4:97–100.
- Hong CS, Koo EH (1997) Isolation and characterization of *Drosophila* presenilin homolog. *Neuroreport* 8:665–668.
- Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, Yang F, Cole G (1996) Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274:99–102.
- Huang JY, Hafez DM, James BD, Bennett DA, Marr RA (2012) Altered NEP2 expression and activity in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 28:433–441.
- Huse JT, Pijak DS, Leslie GJ, Lee VM, Doms RW (2000) Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem* 275:33729–33737.
- Iijima-Ando K, Iijima K (2010) Transgenic *Drosophila* models of Alzheimer's disease and tauopathies. *Brain Struct Funct* 214:245–262.
- Iijima K, Chiang H-C, Hearn SA, Hakker I, Gatt A, Shenton C, Granger L, Leung A, Iijima-Ando K, Zhong Y (2008) Abeta42 mutants with different aggregation profiles induce distinct pathologies in *Drosophila*. *PloS One* 3:e1703.
- Iijima K, Liu H-P, Chiang A-S, Hearn SA, Konsolaki M, Zhong Y (2004) Dissecting the pathological effects of human A β 40 and A β 42 in *Drosophila*: a potential model for Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:6623–6628.
- Inestrosa NC, Varela-Nallar L (2014) Wnt signaling in the nervous system and in Alzheimer's disease. *J Mol Cell Biol* 6:64–74.
- Irizarry MC, Soriano F, McNamara M, Page KJ, Schenk D, Games D, Hyman BT (1997) Abeta deposition is associated with neuropil changes, but not with overt neuronal loss in the human amyloid precursor protein V717F (PDAPP) transgenic mouse. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 17:7053–7059.
- Isabel G, Pascual A, Preat T (2004) Exclusive consolidated memory phases in *Drosophila*. *Science* 304:1024–1027.
- Itagaki S, McGeer PL, Akiyama H, Zhu S, Selkoe D (1989) Relationship of microglia and astrocytes to amyloid deposits of Alzheimer disease. *J Neuroimmunol* 24:173–182.

- Ito K, Suzuki K, Estes P, Ramaswami M, Yamamoto D, Strausfeld NJ (1998) The organization of extrinsic neurons and their implications in the functional roles of the mushroom bodies in *Drosophila melanogaster* Meigen. *Learn Mem* 5:52–77.
- Iwata N, Tsubuki S, Takaki Y, Shirotani K, Lu B, Gerard NP, Gerard C, Hama E, Lee HJ, Saido TC (2001) Metabolic regulation of brain Abeta by neprilysin. *Science* 292:1550–1552.
- Jankowsky JL, Younkin LH, Gonzales V, Fadale DJ, Slunt HH, Lester HA, Younkin SG, Borchelt DR (2007) Rodent A beta modulates the solubility and distribution of amyloid deposits in transgenic mice. *J Biol Chem* 282:22707–22720.
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT (1993) The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry (Mosc)* 32:4693–4697.
- Jefferis GS, Marin EC, Stocker RF, Luo L (2001) Target neuron prespecification in the olfactory map of *Drosophila*. *Nature* 414:204–208.
- Joachim CL, Morris JH, Selkoe DJ (1989) Diffuse senile plaques occur commonly in the cerebellum in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 135:309–319.
- Jonsson T et al. (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488:96–99.
- Joshi P, Liang JO, DiMonte K, Sullivan J, Pimplikar SW (2009) Amyloid precursor protein is required for convergent-extension movements during Zebrafish development. *Dev Biol* 335:1–11.
- Kalback W, Watson MD, Kokjohn TA, Kuo Y-M, Weiss N, Luehrs DC, Lopez J, Brune D, Sisodia SS, Staufenbiel M, Emmerling M, Roher AE (2002) APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques. *Biochemistry (Mosc)* 41:922–928.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Müller-Hill B (1987) The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* 325:733–736.
- Karran E, Mercken M, De Strooper B (2011) The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* 10:698–712.
- Kawarabayashi T, Shoji M, Harigaya Y, Yamaguchi H, Hirai S (1991) Amyloid beta/A4 protein precursor is widely distributed in both the central and peripheral nervous systems of the mouse. *Brain Res* 552:1–7.
- Kedikian G, Heredia F, Salvador VR, Raimunda D, Isoardi N, Heredia L, Lorenzo A (2010) Secreted amyloid precursor protein and holo-APP bind amyloid beta through distinct domains eliciting different toxic responses on hippocampal neurons. *J Neurosci* 30:1795–1803.
- Khachaturian ZS (1994) Calcium hypothesis of Alzheimer's disease and brain aging. *Ann N Y Acad Sci* 747:1–11.

- Kidd M (1964) ALZHEIMER'S DISEASE--AN ELECTRON MICROSCOPICAL STUDY. *Brain J Neurol* 87:307–320.
- Kimberly WT, Zheng JB, Guénette SY, Selkoe DJ (2001) The intracellular domain of the beta-amyloid precursor protein is stabilized by Fe65 and translocates to the nucleus in a notch-like manner. *J Biol Chem* 276:40288–40292.
- Kim H-J, Kim S-H, Shim S-O, Park E, Kim C, Kim K, Tanouye MA, Yim J (2007) *Drosophila* homolog of APP-BP1 (dAPP-BP1) interacts antagonistically with APPL during *Drosophila* development. *Cell Death Differ* 14:103–115.
- Kitaguchi N, Takahashi Y, Tokushima Y, Shiojiri S, Ito H (1988) Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* 331:530–532.
- Klyubin I, Betts V, Welzel AT, Blennow K, Zetterberg H, Wallin A, Lemere CA, Cullen WK, Peng Y, Wisniewski T, Selkoe DJ, Anwyl R, Walsh DM, Rowan MJ (2008) Amyloid beta protein dimer-containing human CSF disrupts synaptic plasticity: prevention by systemic passive immunization. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28:4231–4237.
- Kojro E, Postina R, Buro C, Meiringer C, Gehrig-Burger K, Fahrenholz F (2006) The neuropeptide PACAP promotes the alpha-secretase pathway for processing the Alzheimer amyloid precursor protein. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol* 20:512–514.
- Kolker DE, Turek FW (1999) The search for circadian clock and sleep genes. *J Psychopharmacol Oxf Engl* 13:S5–S9.
- Koo EH, Sisodia SS, Archer DR, Martin LJ, Weidemann A, Beyreuther K, Fischer P, Masters CL, Price DL (1990) Precursor of amyloid protein in Alzheimer disease undergoes fast anterograde axonal transport. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1561–1565.
- Korkut C, Budnik V (2009) WNTs tune up the neuromuscular junction. *Nat Rev Neurosci* 10:627–634.
- Kraepelin E (1910) *Psychiatrie. Ein Lehrbuch für Studierende und Ärzte Band II Klinische Psychiatrie* 8th edition. Leipzig Barth.
- Kuhn P-H, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010) ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* 29:3020–3032.
- Kuo YM, Kokjohn TA, Beach TG, Sue LI, Brune D, Lopez JC, Kalback WM, Abramowski D, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Roher AE (2001) Comparative analysis of amyloid-beta chemical structure and amyloid plaque morphology of transgenic mouse and Alzheimer's disease brains. *J Biol Chem* 276:12991–12998.
- LaFerla FM, Tinkle BT, Bieberich CJ, Haudenschild CC, Jay G (1995) The Alzheimer's A beta peptide induces neurodegeneration and apoptotic cell death in transgenic mice. *Nat Genet* 9:21–30.
- Lai A, Sisodia SS, Trowbridge IS (1995) Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 270:3565–3573.

- Lallemand D, Curto M, Saotome I, Giovannini M, McClatchey AI (2003) NF2 deficiency promotes tumorigenesis and metastasis by destabilizing adherens junctions. *Genes Dev* 17:1090–1100.
- Lambert J-C, Amouyel P (2007) Genetic heterogeneity of Alzheimer's disease: complexity and advances. *Psychoneuroendocrinology* 32 Suppl 1:S62–S70.
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999) Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:3922–3927.
- Lannfelt L, Basun H, Vigo-Pelfrey C, Wahlund LO, Winblad B, Lieberburg I, Schenk D (1995) Amyloid beta-peptide in cerebrospinal fluid in individuals with the Swedish Alzheimer amyloid precursor protein mutation. *Neurosci Lett* 199:203–206.
- Larner AJ (2013) Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease: an update on genotype-phenotype relationships. *J Alzheimers Dis JAD* 37:653–659.
- Larsson MC, Domingos AI, Jones WD, Chiappe ME, Amrein H, Vosshall LB (2004) Or83b encodes a broadly expressed odorant receptor essential for *Drosophila* olfaction. *Neuron* 43:703–714.
- Lee T, Luo L (1999) Mosaic analysis with a repressible cell marker for studies of gene function in neuronal morphogenesis. *Neuron* 22:451–461.
- Lefort R, Pozueta J, Shelanski M (2012) Cross-linking of cell surface amyloid precursor protein leads to increased β -amyloid peptide production in hippocampal neurons: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 32:10674–10685.
- Levin LR, Han PL, Hwang PM, Feinstein PG, Davis RL, Reed RR (1992) The *Drosophila* learning and memory gene *rutabaga* encodes a Ca^{2+} /Calmodulin-responsive adenylyl cyclase. *Cell* 68:479–489.
- Levitan D, Lee J, Song L, Manning R, Wong G, Parker E, Zhang L (2001) PS1 N- and C-terminal fragments form a complex that functions in APP processing and Notch signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12186–12190.
- Levy-Lahad E, Wijsman EM, Nemens E, Anderson L, Goddard KA, Weber JL, Bird TD, Schellenberg GD (1995) A familial Alzheimer's disease locus on chromosome 1. *Science* 269:970–973.
- Lewis PA, Piper S, Baker M, Onstead L, Murphy MP, Hardy J, Wang R, McGowan E, Golde TE (2001) Expression of BRI-amyloid beta peptide fusion proteins: a novel method for specific high-level expression of amyloid beta peptides. *Biochim Biophys Acta* 1537:58–62.
- Leyssen M, Ayaz D, Hébert SS, Reeve S, De Strooper B, Hassan BA (2005) Amyloid precursor protein promotes post-developmental neurite arborization in the *Drosophila* brain. *EMBO J* 24:2944–2955.
- Lieber T, Kidd S, Young MW (2002) Kuzbanian-mediated cleavage of *Drosophila* Notch. *Genes Dev* 16:209–221.

- Li J, Le W (2013) Modeling neurodegenerative diseases in *Caenorhabditis elegans*. *Exp Neurol* 250:94–103.
- Lin H-H, Lai JS-Y, Chin A-L, Chen Y-C, Chiang A-S (2007) A map of olfactory representation in the *Drosophila* mushroom body. *Cell* 128:1205–1217.
- Livingstone MS, Sziber PP, Quinn WG (1984) Loss of calcium/calmodulin responsiveness in adenylate cyclase of rutabaga, a *Drosophila* learning mutant. *Cell* 37:205–215.
- Li W, Tully T, Kalderon D (1996) Effects of a conditional *Drosophila* PKA mutant on olfactory learning and memory. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 2:320–333.
- Li Y, Liu T, Peng Y, Yuan C, Guo A (2004) Specific functions of *Drosophila* amyloid precursor-like protein in the development of nervous system and nonneural tissues. *J Neurobiol* 61:343–358.
- Lord A, Kalimo H, Eckman C, Zhang X-Q, Lannfelt L, Nilsson LNG (2006) The Arctic Alzheimer mutation facilitates early intraneuronal A β aggregation and senile plaque formation in transgenic mice. *Neurobiol Aging* 27:67–77.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA (2000) Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat Neurosci* 3:460–464.
- Lu DC, Soriano S, Bredesen DE, Koo EH (2003) Caspase cleavage of the amyloid precursor protein modulates amyloid beta-protein toxicity. *J Neurochem* 87:733–741.
- Luo L, Martin-Morris LE, White K (1990) Identification, secretion, and neural expression of APPL, a *Drosophila* protein similar to human amyloid protein precursor. *J Neurosci* 10:3849–3861.
- Luo L, Tully T, White K (1992) Human amyloid precursor protein ameliorates behavioral deficit of flies deleted for Appl gene. *Neuron* 9:595–605.
- Ma H, Lesné S, Kotilinek L, Steidl-Nichols JV, Sherman M, Younkin L, Younkin S, Forster C, Sergeant N, Delacourte A, Vassar R, Citron M, Kofuji P, Boland LM, Ashe KH (2007) Involvement of beta-site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) in amyloid precursor protein-mediated enhancement of memory and activity-dependent synaptic plasticity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:8167–8172.
- Malik BR, Gillespie JM, Hodge JJJ (2013) CASK and CaMKII function in the mushroom body α'/β' neurons during *Drosophila* memory formation. *Front Neural Circuits* 7:52.
- Mao Z, Roman G, Zong L, Davis RL (2004) Pharmacogenetic rescue in time and space of the rutabaga memory impairment by using Gene-Switch. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:198–203.
- Marin EC, Jefferis GSXE, Komiyama T, Zhu H, Luo L (2002) Representation of the glomerular olfactory map in the *Drosophila* brain. *Cell* 109:243–255.
- Marquez-Sterling NR, Lo AC, Sisodia SS, Koo EH (1997) Trafficking of cell-surface beta-amyloid precursor protein: evidence that a sorting intermediate participates in synaptic vesicle recycling. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 17:140–151.

- Martin JR, Ernst R, Heisenberg M (1998) Mushroom bodies suppress locomotor activity in *Drosophila melanogaster*. *Learn Mem Cold Spring Harb N* 5:179–191.
- Martin-Morris LE, White K (1990) The *Drosophila* transcript encoded by the beta-amyloid protein precursor-like gene is restricted to the nervous system. *Development* 110:185–195.
- Masliah E, Mallory M, Hansen L, Alford M, Albright T, DeTeresa R, Terry R, Baudier J, Saitoh T (1991) Patterns of aberrant sprouting in Alzheimer's disease. *Neuron* 6:729–739.
- Masliah E, Terry RD, Mallory M, Alford M, Hansen LA (1990) Diffuse plaques do not accentuate synapse loss in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 137:1293–1297.
- Mattson MP, Cheng B, Culwell AR, Esch FS, Lieberburg I, Rydel RE (1993) Evidence for excitoprotective and intraneuronal calcium-regulating roles for secreted forms of the beta-amyloid precursor protein. *Neuron* 10:243–254.
- Mattson MP, Gary DS, Chan SL, Duan W (2001) Perturbed endoplasmic reticulum function, synaptic apoptosis and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochem Soc Symp*:151–162.
- Mayeux R, Stern Y (2012) Epidemiology of Alzheimer disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2.
- McBride SM, Giuliani G, Choi C, Krause P, Correale D, Watson K, Baker G, Siwicki KK (1999) Mushroom body ablation impairs short-term memory and long-term memory of courtship conditioning in *Drosophila melanogaster*. *Neuron* 24:967–977.
- McGeer PL, McGeer EG (1995) The inflammatory response system of brain: implications for therapy of Alzheimer and other neurodegenerative diseases. *Brain Res Brain Res Rev* 21:195–218.
- McGowan E, Eriksen J, Hutton M (2006) A decade of modeling Alzheimer's disease in transgenic mice. *Trends Genet TIG* 22:281–289.
- McGowan E, Sanders S, Iwatsubo T, Takeuchi A, Saido T, Zehr C, Yu X, Uljon S, Wang R, Mann D, Dickson D, Duff K (1999) Amyloid phenotype characterization of transgenic mice overexpressing both mutant amyloid precursor protein and mutant presenilin 1 transgenes. *Neurobiol Dis* 6:231–244.
- McGuire SE, Deshazer M, Davis RL (2005) Thirty years of olfactory learning and memory research in *Drosophila melanogaster*. *Prog Neurobiol* 76:328–347.
- McGuire SE, Mao Z, Davis RL (2004) Spatiotemporal gene expression targeting with the TARGET and gene-switch systems in *Drosophila*. *Sci STKE Signal Transduct Knowl Environ* 2004:pl6.
- McLachlan DR (1986) Aluminum and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 7:525–532.
- Merdes G, Soba P, Loewer A, Bilic MV, Beyreuther K, Paro R (2004) Interference of human and *Drosophila* APP and APP-like proteins with PNS development in *Drosophila*. *EMBO J* 23:4082–4095.

- Mery F, Kawecki TJ (2005) A cost of long-term memory in *Drosophila*. *Science* 308:1148.
- Meziane H, Dodart JC, Mathis C, Little S, Clemens J, Paul SM, Ungerer A (1998) Memory-enhancing effects of secreted forms of the beta-amyloid precursor protein in normal and amnesic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:12683–12688.
- Miyashita T, Oda Y, Horiuchi J, Yin JCP, Morimoto T, Saitoe M (2012) Mg²⁺ Block of *Drosophila* NMDA Receptors Is Required for Long-Term Memory Formation and CREB-Dependent Gene Expression. *Neuron* 74:887–898.
- Miyata A, Arimura A, Dahl RR, Minamino N, Uehara A, Jiang L, Culler MD, Coy DH (1989) Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* 164:567–574.
- Moloney A, Sattelle DB, Lomas DA, Crowther DC (2010) Alzheimer's disease: insights from *Drosophila melanogaster* models. *Trends Biochem Sci* 35:228–235.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat Rev Genet* 5:691–701.
- Mora N, Almudi I, Alsina B, Corominas M, Serras F (2013) β amyloid protein precursor-like (Appl) is a Ras1/MAPK-regulated gene required for axonal targeting in *Drosophila* photoreceptor neurons. *J Cell Sci* 126:53–59.
- Morfini GA, Burns M, Binder LI, Kanaan NM, LaPointe N, Bosco DA, Brown RH, Brown H, Tiwari A, Hayward L, Edgar J, Nave K-A, Garber J, Atagi Y, Song Y, Pigo G, Brady ST (2009) Axonal transport defects in neurodegenerative diseases. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 29:12776–12786.
- Morgan D (2006) Immunotherapy for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis JAD* 9:425–432.
- Morley JE, Farr SA (2014) The role of amyloid-beta in the regulation of memory. *Biochem Pharmacol* 88:479–485.
- Mott RT, Hulette CM (2005) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Neuroimaging Clin N Am* 15:755–765, ix.
- Mucke L, Masliah E, Yu GQ, Mallory M, Rockenstein EM, Tatsuno G, Hu K, Kholodenko D, Johnson-Wood K, McConlogue L (2000) High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J Neurosci* 20:4050–4058.
- Muller UC, Zheng H (2012) Physiological Functions of APP Family Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006288–a006288.
- Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD (1991) A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 254:97–99.
- Murthy M, Fiete I, Laurent G (2008) Testing odor response stereotypy in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 59:1009–1023.
- Nadezhdin KD, Bocharova OV, Bocharov EV, Arseniev AS (2012) Dimeric structure of transmembrane domain of amyloid precursor protein in micellar environment. *FEBS Lett* 586:1687–1692.

- Neuser K, Triphan T, Mronz M, Poeck B, Strauss R (2008) Analysis of a spatial orientation memory in *Drosophila*. *Nature* 453:1244–1247.
- Neve RL, McPhie DL, Chen Y (2000) Alzheimer's disease: a dysfunction of the amyloid precursor protein. *Brain Res* 886:54–66.
- Nighorn A, Healy MJ, Davis RL (1991) The cyclic AMP phosphodiesterase encoded by the *Drosophila dunce* gene is concentrated in the mushroom body neuropil. *Neuron* 6:455–467.
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DDM, Tessier-Lavigne M (2009) APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* 457:981–989.
- Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condron MM, Axelman K, Forsell C, Stenh C, Luthman J, Teplow DB, Younkin SG, Näslund J, Lannfelt L (2001) The "Arctic" APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 4:887–893.
- Nixon RA (2007) Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease. *J Cell Sci* 120:4081–4091.
- O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185–204.
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409–421.
- Ohkawara T, Nagase H, Koh C-S, Nakayama K (2011) The amyloid precursor protein intracellular domain alters gene expression and induces neuron-specific apoptosis. *Gene* 475:1–9.
- Olson MI, Shaw CM (1969) Presenile dementia and Alzheimer's disease in mongolism. *Brain J Neurol* 92:147–156.
- Ono K, Condron MM, Teplow DB (2009) Structure-neurotoxicity relationships of amyloid beta-protein oligomers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:14745–14750.
- Osterwalder T, Yoon KS, White BH, Keshishian H (2001) A conditional tissue-specific transgene expression system using inducible GAL4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12596–12601.
- Oyama F, Sawamura N, Kobayashi K, Morishima-Kawashima M, Kuramochi T, Ito M, Tomita T, Maruyama K, Saido TC, Iwatsubo T, Capell A, Walter J, Grünberg J, Ueyama Y, Haass C, Ihara Y (1998) Mutant presenilin 2 transgenic mouse: effect on an age-dependent increase of amyloid beta-protein 42 in the brain. *J Neurochem* 71:313–322.
- Pan D, Rubin GM (1997) Kuzbanian controls proteolytic processing of Notch and mediates lateral inhibition during *Drosophila* and vertebrate neurogenesis. *Cell* 90:271–280.
- Pan Y, Zhou Y, Guo C, Gong H, Gong Z, Liu L (2009) Differential roles of the fan-shaped body and the ellipsoid body in *Drosophila* visual pattern memory. *Learn Mem Cold*

- Spring Harb N 16:289–295.
- Paquet D, Bhat R, Sydow A, Mandelkow E-M, Berg S, Hellberg S, Fälting J, Distel M, Köster RW, Schmid B, Haass C (2009) A zebrafish model of tauopathy allows in vivo imaging of neuronal cell death and drug evaluation. *J Clin Invest* 119:1382–1395.
- Pardossi-Piquard R, Checler F (2012) The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD: AICD production, regulation, degradation and function. *J Neurochem* 120:109–124.
- Pardossi-Piquard R, Petit A, Kawarai T, Sunyach C, Alves da Costa C, Vincent B, Ring S, D’Adamio L, Shen J, Müller U, St George Hyslop P, Checler F (2005) Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron* 46:541–554.
- Parisiadou L, Bethani I, Michaki V, Krousti K, Rapti G, Efthimiopoulos S (2008) Homer2 and Homer3 interact with amyloid precursor protein and inhibit A β production. *Neurobiol Dis* 30:353–364.
- Pascual A, Huang K-L, Neveu J, Pr at T (2004) Neuroanatomy: brain asymmetry and long-term memory. *Nature* 427:605–606.
- Pascual A, Pr at T (2001) Localization of long-term memory within the *Drosophila* mushroom body. *Science* 294:1115–1117.
- Perry EK (1980) The cholinergic system in old age and Alzheimer’s disease. *Age Ageing* 9:1–8.
- Pla ais P-Y, Trannoy S, Isabel G, Aso Y, Siwanowicz I, Belliard-Gu erin G, Vernier P, Birman S, Tanimoto H, Pr at T (2012) Slow oscillations in two pairs of dopaminergic neurons gate long-term memory formation in *Drosophila*. *Nat Neurosci* 15:592–599.
- Poeck B, Strauss R, Kretschmar D (2012) Analysis of amyloid precursor protein function in *Drosophila melanogaster*. *Exp Brain Res* 217:413–421.
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenne A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004) A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* 113:1456–1464.
- Prasher VP, Farrer MJ, Kessler AM, Fisher EM, West RJ, Barber PC, Butler AC (1998) Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down’s syndrome. *Ann Neurol* 43:380–383.
- Pr at T (1998) Decreased odor avoidance after electric shock in *Drosophila* mutants biases learning and memory tests. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 18:8534–8538.
- Presente A, Boyles RS, Serway CN, de Belle JS, Andres AJ (2004) Notch is required for long-term memory in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:1764–1768.
- Price JL et al. (2009) Neuropathology of nondemented aging: presumptive evidence for preclinical Alzheimer disease. *Neurobiol Aging* 30:1026–1036.

- Prusiner SB (1984) Some speculations about prions, amyloid, and Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 310:661–663.
- Puccio H (2009) Multicellular models of Friedreich ataxia. *J Neurol* 256 Suppl 1:18–24.
- Quinn WG, Harris WA, Benzer S (1974) Conditioned behavior in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 71:708–712.
- Quinn WG, Sziber PP, Booker R (1979) The *Drosophila* memory mutant amnesiac. *Nature* 277:212–214.
- Ramaker JM, Swanson TL, Copenhaver PF (2013) Amyloid Precursor Proteins Interact with the Heterotrimeric G Protein Go in the Control of Neuronal Migration. *J Neurosci* 33:10165–10181.
- Randall AD, Witton J, Booth C, Hynes-Allen A, Brown JT (2010) The functional neurophysiology of the amyloid precursor protein (APP) processing pathway. *Neuropharmacology* 59:243–267.
- Raux G, Guyant-Maréchal L, Martin C, Bou J, Penet C, Brice A, Hannequin D, Frebourg T, Campion D (2005) Molecular diagnosis of autosomal dominant early onset Alzheimer's disease: an update. *J Med Genet* 42:793–795.
- Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A systematic analysis of human disease-associated gene sequences in *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11:1114–1125.
- Ridge PG, Ebbert MTW, Kauwe JSK (2013) Genetics of Alzheimer's disease. *BioMed Res Int* 2013:254954.
- Ring S, Weyer SW, Kilian SB, Waldron E, Pietrzik CU, Filippov MA, Herms J, Buchholz C, Eckman CB, Korte M, Wolfer DP, Muller UC (2007) The Secreted -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APPs Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice. *J Neurosci* 27:7817–7826.
- Rogaev EI, Sherrington R, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, Liang Y, Chi H, Lin C, Holman K, Tsuda T (1995) Familial Alzheimer's disease in kindreds with missense mutations in a gene on chromosome 1 related to the Alzheimer's disease type 3 gene. *Nature* 376:775–778.
- Roman G, Endo K, Zong L, Davis RL (2001) P[Switch], a system for spatial and temporal control of gene expression in *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:12602–12607.
- Rooke J, Pan D, Xu T, Rubin GM (1996) KUZ, a conserved metalloprotease-disintegrin protein with two roles in *Drosophila* neurogenesis. *Science* 273:1227–1231.
- Rosen DR, Martin-Morris L, Luo LQ, White K (1989) A *Drosophila* gene encoding a protein resembling the human beta-amyloid protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:2478–2482.
- Rovelet-Lecrux A, Hannequin D, Raux G, Le Meur N, Laquerrière A, Vital A, Dumanchin C, Feuillette S, Brice A, Vercelletto M, Dubas F, Frebourg T, Campion D (2006) APP

- locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet* 38:24–26.
- Saito T, Matsuba Y, Mihira N, Takano J, Nilsson P, Itohara S, Iwata N, Saido TC (2014) Single App knock-in mouse models of Alzheimer’s disease. *Nat Neurosci* Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/nn.3697> [Accessed April 22, 2014].
- Sakai T, Kitamoto T (2006) Differential roles of two major brain structures, mushroom bodies and central complex, for *Drosophila* male courtship behavior. *J Neurobiol* 66:821–834.
- Sakono M, Zako T (2010) Amyloid oligomers: formation and toxicity of A β oligomers: Formation of toxic A β oligomers. *FEBS J* 277:1348–1358.
- Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Edition. Cold Spring Harb Lab Press 18:47–59.
- Sarantseva S, Schwarzman A (2011) Modeling amyloid diseases in fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Amyloidosis—Mechanisms and Prospects for Therapy*/Edited by S. Sarantseva.—Rijeka: Intech. Available at: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/20531.pdf> [Accessed March 27, 2013].
- Sarantseva S, Timoshenko S, Bolshakova O, Karaseva E, Rodin D, Schwarzman AL, Vitek MP (2009) Apolipoprotein E-mimetics inhibit neurodegeneration and restore cognitive functions in a transgenic *Drosophila* model of Alzheimer’s disease. *PloS One* 4:e8191.
- Sawamura N, Morishima-Kawashima M, Waki H, Kobayashi K, Kuramochi T, Frosch MP, Ding K, Ito M, Kim TW, Tanzi RE, Oyama F, Tabira T, Ando S, Ihara Y (2000) Mutant presenilin 2 transgenic mice. A large increase in the levels of Abeta 42 is presumably associated with the low density membrane domain that contains decreased levels of glycerophospholipids and sphingomyelin. *J Biol Chem* 275:27901–27908.
- Scheuermann S, Hamsch B, Hesse L, Stumm J, Schmidt C, Behr D, Bayer TA, Beyreuther K, Multhaup G (2001) Homodimerization of amyloid precursor protein and its implication in the amyloidogenic pathway of Alzheimer’s disease. *J Biol Chem* 276:33923–33929.
- Schlöndorff J, Blobel CP (1999) Metalloprotease-disintegrins: modular proteins capable of promoting cell-cell interactions and triggering signals by protein-ectodomain shedding. *J Cell Sci* 112 (Pt 21):3603–3617.
- Schmitt U, Hiemke C, Fahrenholz F, Schroeder A (2006) Over-expression of two different forms of the alpha-secretase ADAM10 affects learning and memory in mice. *Behav Brain Res* 175:278–284.
- Schwarzman AL, Tsiper M, Gregori L, Goldgaber D, Frakowiak J, Mazur-Kolecka B, Taraskina A, Pchelina S, Vitek MP (2005) Selection of peptides binding to the amyloid b-protein reveals potential inhibitors of amyloid formation. *Amyloid Int J Exp Clin Investig Off J Int Soc Amyloidosis* 12:199–209.
- Seabrook GR, Smith DW, Bowery BJ, Easter A, Reynolds T, Fitzjohn SM, Morton RA, Zheng H, Dawson GR, Sirinathsinghji DJ, Davies CH, Collingridge GL, Hill RG (1999) Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology* 38:349–359.

- Selkoe DJ (2008) Soluble oligomers of the amyloid beta-protein impair synaptic plasticity and behavior. *Behav Brain Res* 192:106–113.
- Sennvik K, Fastbom J, Blomberg M, Wahlund LO, Winblad B, Benedikz E (2000) Levels of alpha- and beta-secretase cleaved amyloid precursor protein in the cerebrospinal fluid of Alzheimer's disease patients. *Neurosci Lett* 278:169–172.
- Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Esch F, Lee M, Dovey H, Davis D, Sinha S, Schlossmacher M, Whaley J, Swindlehurst C (1992) Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* 359:325–327.
- Shaked GM, Chauv S, Ubhi K, Hansen LA, Masliah E (2009) Interactions between the amyloid precursor protein C-terminal domain and G proteins mediate calcium dysregulation and amyloid beta toxicity in Alzheimer's disease. *FEBS J* 276:2736–2751.
- Shaked GM, Kummer MP, Lu DC, Galvan V, Bredesen DE, Koo EH (2006) Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624). *FASEB J* 20:1254–1256.
- Sherrington R et al. (1995) Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 375:754–760.
- Shimada T, Kato K, Kamikouchi A, Ito K (2005) Analysis of the distribution of the brain cells of the fruit fly by an automatic cell counting algorithm. *Physica* 350:144–149.
- Shoji M, Golde TE, Ghiso J, Cheung TT, Estus S, Shaffer LM, Cai XD, McKay DM, Tintner R, Frangione B (1992) Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science* 258:126–129.
- Sinha S, Anderson JP, Barbour R, Basi GS, Caccavello R, Davis D, Doan M, Dovey HF, Frigon N, Hong J (1999) Purification and cloning of amyloid precursor protein β -secretase from human brain. *Nature* 402:537–540.
- Sipe JD, Cohen AS (2000) Review: history of the amyloid fibril. *J Struct Biol* 130:88–98.
- Sisodia SS, Koo EH, Hoffman PN, Perry G, Price DL (1993) Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 13:3136–3142.
- Sisodia S, Koo E, Beyreuther K, Unterbeck A, Price D (1990) Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*.
- Skoulakis EM, Kalderon D, Davis RL (1993) Preferential expression in mushroom bodies of the catalytic subunit of protein kinase A and its role in learning and memory. *Neuron* 11:197–208.
- Small DH, Nurcombe V, Moir R, Michaelson S, Monard D, Beyreuther K, Masters CL (1992) Association and release of the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease from chick brain extracellular matrix. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 12:4143–4150.
- Smith-Swintosky VL, Pettigrew LC, Craddock SD, Culwell AR, Rydel RE, Mattson MP (1994) Secreted forms of beta-amyloid precursor protein protect against ischemic

- brain injury. *J Neurochem* 63:781–784.
- Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Löwer A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Müller U, Kins S, Beyreuther K (2005) Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* 24:3624–3634.
- Sola Vigo F, Kedikian G, Heredia L, Heredia F, Añel AD, Rosa AL, Lorenzo A (2009) Amyloid-beta precursor protein mediates neuronal toxicity of amyloid beta through Go protein activation. *Neurobiol Aging* 30:1379–1392.
- Soldano A, Okray Z, Janovska P, Tmejová K, Reynaud E, Claeys A, Yan J, Atak ZK, De Strooper B, Dura J-M, Bryja V, Hassan BA (2013) The *Drosophila* Homologue of the Amyloid Precursor Protein Is a Conserved Modulator of Wnt PCP Signaling. *PLoS Biol* 11:e1001562.
- Sone M, Uchida A, Komatsu A, Suzuki E, Ibuki I, Asada M, Shiwaku H, Tamura T, Hoshino M, Okazawa H, Nabeshima Y (2009) Loss of yata, a novel gene regulating the subcellular localization of APPL, induces deterioration of neural tissues and lifespan shortening. *PLoS ONE* 4:e4466.
- Sperber BR, Leight S, Goedert M, Lee VM (1995) Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells. *Neurosci Lett* 197:149–153.
- Steiner H, Winkler E, Edbauer D, Prokop S, Basset G, Yamasaki A, Kostka M, Haass C (2002) PEN-2 is an integral component of the gamma-secretase complex required for coordinated expression of presenilin and nicastrin. *J Biol Chem* 277:39062–39065.
- Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F (1995) An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde." *Clin Anat* 8:429–431.
- St George-Hyslop PH, Petit A (2005) Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C R Biol* 328:119–130.
- Stocker RF (1994) The organization of the chemosensory system in *Drosophila melanogaster*: a review. *Cell Tissue Res* 275:3–26.
- Stocker RF, Heimbeck G, Gendre N, de Belle JS (1997) Neuroblast ablation in *Drosophila* P[GAL4] lines reveals origins of olfactory interneurons. *J Neurobiol* 32:443–456.
- Stocker RF, Lienhard MC, Borst A, Fischbach KF (1990) Neuronal architecture of the antennal lobe in *Drosophila melanogaster*. *Cell Tissue Res* 262:9–34.
- Strauss R, Heisenberg M (1993) A higher control center of locomotor behavior in the *Drosophila* brain. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 13:1852–1861.
- Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (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.
- Struhl G, Greenwald I (1999) Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*. *Nature* 398:522–525.

- Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, Ledermann B, Bürki K, Frey P, Paganetti PA, Waridel C, Calhoun ME, Jucker M, Probst A, Staufenbiel M, Sommer B (1997) Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:13287–13292.
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994) An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264:1336–1340.
- Tanaka NK, Tanimoto H, Ito K (2008) Neuronal assemblies of the *Drosophila* mushroom body. *J Comp Neurol* 508:711–755.
- Tanzi RE, Gusella JF, Watkins PC, Bruns GA, St George-Hyslop P, Van Keuren ML, Patterson D, Pagan S, Kurnit DM, Neve RL (1987) Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science* 235:880–884.
- Tarragon E, Lopez D, Estrada C, Ana G-C, Schenker E, Pifferi F, Bordet R, Richardson JC, Herrero MT (2013) *Octodon degus*: a model for the cognitive impairment associated with Alzheimer's disease. *CNS Neurosci Ther* 19:643–648.
- Taru H, Iijima K-I, Hase M, Kirino Y, Yagi Y, Suzuki T (2002) Interaction of Alzheimer's beta -amyloid precursor family proteins with scaffold proteins of the JNK signaling cascade. *J Biol Chem* 277:20070–20078.
- Taylor CJ, Ireland DR, Ballagh I, Bourne K, Marechal NM, Turner PR, Bilkey DK, Tate WP, Abraham WC (2008) Endogenous secreted amyloid precursor protein-alpha regulates hippocampal NMDA receptor function, long-term potentiation and spatial memory. *Neurobiol Dis* 31:250–260.
- Terry RD (1979) Morphological changes in Alzheimer's disease-senile dementia: ultrastructural changes and quantitative studies. *Res Publ - Assoc Res Nerv Ment Dis* 57:99–105.
- Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615–29619.
- Tomiyama T, Nagata T, Shimada H, Teraoka R, Fukushima A, Kanemitsu H, Takuma H, Kuwano R, Imagawa M, Ataka S, Wada Y, Yoshioka E, Nishizaki T, Watanabe Y, Mori H (2008) A new amyloid beta variant favoring oligomerization in Alzheimer's-type dementia. *Ann Neurol* 63:377–387.
- Torroja L, Chu H, Kotovsky I, White K (1999a) Neuronal overexpression of APPL, the *Drosophila* homologue of the amyloid precursor protein (APP), disrupts axonal transport. *Curr Biol* 9:489–492.
- Torroja L, Luo L, White K (1996) APPL, the *Drosophila* member of the APP-family, exhibits differential trafficking and processing in CNS neurons. *J Neurosci* 16:4638–4650.
- Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999b) The *Drosophila* beta-amyloid precursor protein homolog promotes synapse differentiation at the neuromuscular junction. *J Neurosci* 19:7793–7803.

- Tully T, Preat T, Boynton SC, Del Vecchio M (1994) Genetic dissection of consolidated memory in *Drosophila*. *Cell* 79:35–47.
- Tully T, Quinn WG (1985) Classical conditioning and retention in normal and mutant *Drosophila melanogaster*. *J Comp Physiol* 157:263–277.
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70:1–32.
- Urbanc B, Cruz L, Le R, Sanders J, Ashe KH, Duff K, Stanley HE, Irizarry MC, Hyman BT (2002) Neurotoxic effects of thioflavin S-positive amyloid deposits in transgenic mice and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:13990–13995.
- Van Dam D, De Deyn PP (2011) Animal models in the drug discovery pipeline for Alzheimer's disease. *Br J Pharmacol* 164:1285–1300.
- Van de Hoef DL, Hughes J, Livne-Bar I, Garza D, Konsolaki M, Boulianne GL (2009) Identifying genes that interact with *Drosophila* presenilin and amyloid precursor protein. *genesis* 47:246–260.
- Vassar R et al. (1999) Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286:735–741.
- Villemagne VL, Fodero-Tavoletti MT, Pike KE, Cappai R, Masters CL, Rowe CC (2008) The ART of loss: Abeta imaging in the evaluation of Alzheimer's disease and other dementias. *Mol Neurobiol* 38:1–15.
- Vincent B, Checler F (2012) α -Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins. *Curr Alzheimer Res* 9:140–156.
- Vincent B, Govitrapong P (2011) Activation of the α -secretase processing of A β PP as a therapeutic approach in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 24 Suppl 2:75–94.
- Vincent I, Rosado M, Davies P (1996) Mitotic mechanisms in Alzheimer's disease? *J Cell Biol* 132:413–425.
- Vingtdeux V, Marambaud P (2012) Identification and biology of α -secretase: Identification and biology of α -secretase. *J Neurochem* 120:34–45.
- Von Arnim CAF, Kinoshita A, Peltan ID, Tangredi MM, Herl L, Lee BM, Spoelgen R, Hshieh TT, Ranganathan S, Battey FD, Liu C-X, Bacskai BJ, Sever S, Irizarry MC, Strickland DK, Hyman BT (2005) The low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) is a novel beta-secretase (BACE1) substrate. *J Biol Chem* 280:17777–17785.
- Von Rotz RC, Kohli BM, Bosset J, Meier M, Suzuki T, Nitsch RM, Konietzko U (2004) The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *J Cell Sci* 117:4435–4448.
- Vosshall LB, Amrein H, Morozov PS, Rzhetsky A, Axel R (1999) A spatial map of olfactory receptor expression in the *Drosophila* antenna. *Cell* 96:725–736.
- Vosshall LB, Wong AM, Axel R (2000) An olfactory sensory map in the fly brain. *Cell*

- 102:147–159.
- Walsh DM, Selkoe DJ (2007) A beta oligomers - a decade of discovery. *J Neurochem* 101:1172–1184.
- Wang Y, Ha Y (2004) The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell* 15:343–353.
- Wang Y, Mamiya A, Chiang A, Zhong Y (2008) Imaging of an early memory trace in the *Drosophila* mushroom body. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28:4368–4376.
- Wang Y, Wright NJ, Guo H, Xie Z, Svoboda K, Malinow R, Smith DP, Zhong Y (2001) Genetic manipulation of the odor-evoked distributed neural activity in the *Drosophila* mushroom body. *Neuron* 29:267–276.
- Wegmann S, Jung YJ, Chinnathambi S, Mandelkow E-M, Mandelkow E, Muller DJ (2010) Human Tau isoforms assemble into ribbon-like fibrils that display polymorphic structure and stability. *J Biol Chem* 285:27302–27313.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K (1989) Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57:115–126.
- Wentzell JS, Bolkan BJ, Carmine-Simmen K, Swanson TL, Musashe DT, Kretzschmar D (2012) Amyloid precursor proteins are protective in *Drosophila* models of progressive neurodegeneration. *Neurobiol Dis* 46:78–87.
- Wesson DW, Levy E, Nixon RA, Wilson DA (2010) Olfactory dysfunction correlates with amyloid-beta burden in an Alzheimer's disease mouse model. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 30:505–514.
- Whitworth AJ (2011) *Drosophila* models of Parkinson's disease. *Adv Genet* 73:1–50.
- Willem M, Garratt AN, Novak B, Citron M, Kaufmann S, Rittger A, DeStrooper B, Saftig P, Birchmeier C, Haass C (2006) Control of peripheral nerve myelination by the beta-secretase BACE1. *Science* 314:664–666.
- Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A (2010) VPS10P-domain receptors — regulators of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci* Available at: http://www.nature.com/nrn/journal/v9/n12/fig_tab/nrn2516_F4.html [Accessed September 3, 2014].
- Wisniewski T, Boutajangout A (2010) Vaccination as a therapeutic approach to Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med N Y* 77:17–31.
- Wisniewski T, Castaño EM, Golabek A, Vogel T, Frangione B (1994) Acceleration of Alzheimer's fibril formation by apolipoprotein E in vitro. *Am J Pathol* 145:1030–1035.
- Wolfe MS (2008) Selective amyloid- β lowering agents. *BMC Neurosci* 9:S4.
- Wolfe MS (2012a) γ -Secretase as a target for Alzheimer's disease. *Adv Pharmacol San Diego Calif* 64:127–153.
- Wolfe MS (2012b) Processive proteolysis by γ -secretase and the mechanism of Alzheimer's disease. *Biol Chem* 393:899–905.

- Wolfe MS, Xia W, Ostaszewski BL, Diehl TS, Kimberly WT, Selkoe DJ (1999) Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and gamma-secretase activity. *Nature* 398:513–517.
- Wong H-K, Sakurai T, Oyama F, Kaneko K, Wada K, Miyazaki H, Kurosawa M, De Strooper B, Saftig P, Nukina N (2005) beta Subunits of voltage-gated sodium channels are novel substrates of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme (BACE1) and gamma-secretase. *J Biol Chem* 280:23009–23017.
- Wu C-L, Xia S, Fu T-F, Wang H, Chen Y-H, Leong D, Chiang A-S, Tully T (2007) Specific requirement of NMDA receptors for long-term memory consolidation in *Drosophila* ellipsoid body. *Nat Neurosci* 10:1578–1586.
- Xia W, Wong ST, Hanlon E, Morin P (2012) γ -Secretase modulator in Alzheimer's disease: shifting the end. *J Alzheimers Dis JAD* 31:685–696.
- Ye Y, Lukinova N, Fortini ME (1999) Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants. *Nature* 398:525–529.
- Yin JC, Del Vecchio M, Zhou H, Tully T (1995) CREB as a memory modulator: induced expression of a dCREB2 activator isoform enhances long-term memory in *Drosophila*. *Cell* 81:107–115.
- Young JW, Sharkey J, Finlayson K (2009) Progressive impairment in olfactory working memory in a mouse model of Mild Cognitive Impairment. *Neurobiol Aging* 30:1430–1443.
- Zheng H, Jiang M, Trumbauer ME, Sirinathsinghji DJ, Hopkins R, Smith DW, Heavens RP, Dawson GR, Boyce S, Conner MW, Stevens KA, Slunt HH, Sisoda SS, Chen HY, Van der Ploeg LH (1995) beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity. *Cell* 81:525–531.
- Zheng H, Koo EH (2011) Biology and pathophysiology of the amyloid precursor protein. *Mol Neurodegener* 6:27.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est un trouble neurodégénératif qui se manifeste, entre autres, par une détérioration progressive de la mémoire. Le peptide amyloïde (A β), composant principal des plaques séniles retrouvées dans le cerveau des patients, a longtemps été considéré comme le principal responsable de ce dysfonctionnement mnésique. Néanmoins, les mécanismes moléculaires à l'origine du déclin de la mémoire restent à ce jour inconnus. Le peptide A β est produit par la protéolyse d'une protéine transmembranaire appelée Protéine Précurseur Amyloïde (APP). APP subit deux voies de maturation exclusives. La voie non-amyloïdogénique, majoritaire, est initiée par l' α -sécrétase, et produit notamment une forme sécrétée neuroprotective, sAPP α . La voie amyloïdogénique, après clivages successifs par les β - et γ -sécrétases, aboutit à la sécrétion du peptide A β . Dans des conditions pathologiques, la voie amyloïdogénique serait favorisée, éventuellement au détriment de la voie non-amyloïdogénique. Il a été proposé qu'en plus de l'effet néfaste de l'accumulation d'A β , une perte de fonction d'APP puisse jouer un rôle dans le dysfonctionnement cognitif associé à la MA, en particulier au début de la maladie.

La drosophile possède un orthologue d'APP, APP-like (APPL), soumis à deux voies de maturation similaires à celles d'APP. La drosophile est capable de former différents types de mémoire dont les caractéristiques moléculaires principales sont partagées avec les organismes supérieurs. Le laboratoire a mis en évidence l'implication d'APPL chez la mouche adulte dans la mémoire olfactive associative (Goguel et al., 2011). Au cours de ma thèse, nous avons poursuivi deux objectifs : 1) identifier le ou les métabolites d'APPL impliqués dans la mise en place de la mémoire, et 2) analyser l'incidence de la surexpression de la voie amyloïdogénique chez le jeune adulte. Nous avons pour cela développé un modèle permettant à la fois de diminuer le niveau d'APPL endogène, et d'exprimer sous contrôle d'un pilote d'expression inductible un transgène d'intérêt spécifiquement dans les Corps Pédonculés, le centre de l'apprentissage et de la mémoire olfactive chez l'adulte. Nous avons démontré grâce à ce modèle que les formes sécrétée et non-protéolysée d'APPL sont chacune suffisante pour compenser le déficit de mémoire à court-terme lié à la perte partielle d'APPL. Nous avons aussi montré que favoriser la production de formes sécrétées au détriment des formes non protéolysées, en surexprimant l' α -sécrétase, exacerbe ce déficit mnésique, suggérant que ces deux formes d'APPL sont requises conjointement pour la mise en place de la mémoire. D'autre part, nous avons montré que la surexpression de la β -sécrétase ou celle du peptide A β (dA β) de drosophile, n'est délétère pour la mémoire que lorsqu'elle est associée à une inhibition d'APPL. Nous avons ainsi mis à jour deux types d'interaction fonctionnelle entre APPL et ses métabolites : une interaction positive entre les formes sécrétées et membranaires, qui pourrait sous-tendre la mise en place de la mémoire dans des conditions physiologiques, et une interaction négative entre APPL et dA β , qui pourrait au contraire participer à l'aggravation des déficits mnésiques observés au cours de l'évolution de la MA.