



HAL
open science

Analyse d'un nouveau modèle transgénique murin d'Alzheimer à début tardif basé sur la surexpression de BIN1 et induisant des endophénotypes précliniques de la maladie

Rachel Daudin

► **To cite this version:**

Rachel Daudin. Analyse d'un nouveau modèle transgénique murin d'Alzheimer à début tardif basé sur la surexpression de BIN1 et induisant des endophénotypes précliniques de la maladie. Médecine humaine et pathologie. Université Sorbonne Paris Cité, 2016. Français. NNT : 2016USPCB034 . tel-01589667

HAL Id: tel-01589667

<https://theses.hal.science/tel-01589667>

Submitted on 18 Sep 2017

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.

THESE

PRESENTEE A

L'UNIVERSITE PARIS DESCARTES

ECOLE DOCTORALE CERVEAU COGNITION COMPORTEMENT

PAR

Rachel DAUDIN

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE

Docteur

SPECIALITE NEUROSCIENCES

ANALYSE D'UN NOUVEAU MODELE TRANSGENIQUE MURIN
D'ALZHEIMER A DEBUT TARDIF BASE SUR LA SUREXPRESSON DE
BIN1 ET INDUISANT DES ENDOPHENOTYPES PRECLINIQUES DE LA
MALADIE

Thèse soutenue le 23 juin 2016

Après avis de :

Mme Nathalie Cartier, DR, INSERM, Univ. Paris-Saclay

Mr Luc Buée, DR, CNRS, Univ. Lille

Devant la commission d'examen formée de :

Mme Nathalie Cartier, DR, INSERM, Univ. Paris-Saclay.....Rapporteur

Mr Luc Buée, DR, CNRS, Univ. Lille.....Rapporteur

Mr Thierry Galli, DR, INSERM, Univ. Paris V.....Examineur

Mr Ronald Melki, DR, CNRS, Univ. Paris-Saclay.....Examineur

Mr Michel Simonneau, PU, INSERM, ENS Cachan.....Examineur

Mr Jean-Christophe Rain, Directeur Général délégué, HYBRIGENICS.....Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les différents membres de mon jury d'avoir accepté d'assister à ma soutenance de thèse, le Dr Ronald Melki, le Dr Thierry Galli et particulièrement mes deux rapporteurs, le Dr Luc Buée et le Dr Nathalie Cartier, pour avoir évalué ce manuscrit.

Je remercie également Jacques Epelbaum de m'avoir accueilli au Centre de Psychiatrie et Neurosciences et Rémi Delansorne de m'avoir accueilli au sein de son entreprise, Hybrigenics.

Un grand Merci à mes deux encadrants de thèse : le Pr. Michel Simonneau et le Dr. Jean-Christophe Rain. Michel, je tiens à vous remercier de la liberté que vous m'avez laissé sur la gestion du projet de thèse et pour avoir toujours écouté et pris en compte mon avis. Merci pour les discussions très enrichissantes sur la Science et le monde de la recherche académique, ainsi que pour votre soutien dans la dernière ligne droite de l'écrit et de la soutenance. Jean-Christophe, je tiens à te remercier pour ton aide et tes conseils, ta sympathie et ta gentillesse. Tu auras été un véritable soutien durant cette aventure.

Ces trois années avec vous, entre laboratoire et entreprise, auront été pour moi très enrichissantes autant humainement que professionnellement.

Un énorme merci à toutes les personnes du Centre de Psychiatrie et Neurosciences.

Tout d'abord, Mille Mercis à ma petite équipe ! Julia, Yann, Aude-Marie et Simon. Aude-Marie, tu m'auras beaucoup appris, merci de ton temps et aussi de ton aide. Julia et Yann... Aaaaah ;) ça va me manquer !! Julia, merci d'avoir été là, de m'avoir écoutée, aidée, et aussi beaucoup fait marrer, ça aurait été tellement plus dur sans toi (pensée émue pour Julia et Rachel jr haha). Yann, merci pour ta coolitude, également nécessaire à la survie de la thésarde. Et puis toute ton aide précieuse en bioinfo évidemment ! Et je n'oublie pas Nicolas, merci pour ton soutien durant ces trois années.

Puis étage par étage...

Au 1^{er}. Je remercie toute l'équipe de Bernadette Allinquant. Lucie et Emilie, merci pour vos conseils et vos petits dépannages en cultures primaires. Bernadette, merci pour votre gentillesse.

Le 2^{ème}. Merci à toute l'équipe de Michèle Darmon, surtout les Dr Justine Masson et Jorge Diaz. Jorge, merci de m'avoir formé à l'histologie et au Dil avec autant de patience et de gentillesse, ainsi que de m'avoir aidé à monter ce super GeneGun ! Les moments de manipulations dans ton laboratoire auront été de vrais moments de repos dans la tempête de la thèse. Merci à toute votre équipe pour nous avoir toujours dépanné et conseillé.

Au 3^{ème} ! Merci Elisabeth, tout d'abord et évidemment pour la microdissection. Entre deux chouquettes et trois bonbons à l'ancienne, j'aurais passé de très bons moments avec toi et cette grosse machine. Et puis pour tout le reste...merci pour ta présence tout au long de ma thèse, pour m'avoir aidé et soutenue dans les moments difficiles. Ratatouille veille au grain, tu ne pourras pas m'oublier !

Je tiens à remercier également les Dr Patrick Dutar et Brigitte Potier qui se sont chargés de toute la partie électrophysiologie des BIN1. Merci pour cette collaboration, pour votre sympathie, votre gentillesse, votre souplesse. Ça aura été un grand plaisir de travailler et d'apprendre avec vous.

Merci à tout le 4^{ème} ! Merci au Dr Cécile Viollet, pour ton dynamisme toujours motivant, mais aussi pour ta gentillesse. Merci Axelle ! Pour tout ton attirail d'histologie (le kit congélation, le super cryotome, les anticorps...), et tes conseils avisés. Merci Philippe pour ton aide bienveillante et toujours disponible. Merci David ! Pour m'avoir tout appris du confocale et des logiciels, pour m'avoir fait des supers macros d'ImageJ, pour m'avoir fait participer à des concours photos (l'I-pad haha). Alexandra, merci pour ton aide lorsque tu étais à l'animalerie et encore après. Elisa te doit une fière chandelle (la PFA, les injections de BrdU...) ! Merci de tout le temps que tu m'as accordé. Et puis on s'est bien marré aussi ! Je t'envoie pleins d'ondes positives pour la fin de ta thèse, tu vas assurer ! Oriane, merci à toi aussi, pour ton aide et pour nos papotages au 5^{ème}. Je croise les doigts pour tes projets futurs ;) Je n'oublie pas non plus Nathan et Candice, on aura bien ri ! Un grand merci au Dr Michel Pohl et à Annie, qui m'ont appris à tenir une pipette en Master1 et qui m'ont donné le goût de la recherche.

Au 5^{ème}. Un grand merci à Nadia et aux animaliers, Chloé, Dominique, et un merci spécial à Alice, pour t'être si bien occupé de mes petites BIN1 !

Je remercie enfin toutes les personnes de l'administration, Cathia, Christophe, Claude, Martine, Philippe, ainsi que tout le personnel d'entretien, pour le sourire dès le petit matin !

A ma super entreprise,

Merci à tout Hybrigenics, avec sa bonne humeur, sa gentillesse et ses gâteaux et autres viennoiseries, crêpes, essais culinaires presque tous les matins ! Vous aurez tous été d'un grand soutien durant ces trois ans.

Au début je n'étais qu'une petite stagiaire... Céline, merci de m'avoir tout réappris des secrets de la biologie moléculaire. C'était pas une mince affaire soyons honnêtes !

Et puis la thèse a commencé...Merci de m'avoir gardé une petite place auprès de vous au début de mes aventures à l'INSERM, ça n'aura pas été facile de changer définitivement de bureau et de vous quitter. A tout l'ancien labo du fond avec ses petites fenêtres mais sa super ambiance ! Michaël, ce n'est pas raisonnable d'être aussi gentil ! Merci !!! Pour toutes ces heures que tu as prises à m'aider, me conseiller, et m'écouter. Anémone, merci pour ta gentillesse, ton aide pour mes petits clonages, ta présence. J'aurais un peu raclé quand même, hein ? Nadhira, merci pour ces bonnes parties de rigolade ! J'aurais vraiment passé de supers moments avec vous trois.

A la R&D Céline, Cécile, Susan, Véro. Merci pour les P' de HEK et pour les places sur les gels de Western ! Céline, merci d'avoir continué à m'apprendre et à m'aider tout au long de ma thèse (l'hybridation in situ...), quelque part, j'étais encore un peu ta stagiaire. Merci Stéphanie, pour nos papotages, pour ton aide et ta gentillesse. Petite pensée pour C21 haha!

Et tous les autres du labo. Vous m'aurez tous aidé, Gisèle, Sandrine, Alexis, Laura, Audrey, Kais, Muguette, Fanny, Souad, Alyssia, Karima. Chacun d'entre vous m'aura au moins une fois remontré où était le kit de maxi, trouvé une solution, passé un burner ... Bien sûr, merci pour les cribles, sans vous ma thèse aurait finalement eu bien du mal à se construire.

Dans le coin des bureaux... Merci à tous, à Jacques, Valérie M. Merci Etienne, Aurélie, Guillaume, Barbara. On aura passé moins de temps ensemble, mais ça aura toujours été un grand plaisir ! Valérie H., j'aurais passé de supers moments avec toi dans l'aventure AgedBrain, merci pour nos discussions, pour ta gentillesse, et bien sûr pour tout ces résultats de cribles !

Et mes collaborateurs...

Merci à toute la joyeuse équipe de l'ISMO/CPBM qui m'a permis de faire la super-résolution de BIN1 : Sandrine Lévêque-Fort, Guillaume Dupuis, Sandrine Lécart et surtout Nicolas Bourg. Nicolas, mes petites virées à Orsay auront été bien sympathiques grâce à ton accueil. Je te souhaite plein de réussite dans ton nouveau projet.

Un grand merci aux personnes de l'IGBMC/ICS avec qui nous avons travaillé sur les petites BIN1, au Dr. Yann Héroult, mais aussi à Guillaume Pavlovic et surtout Damien Maréchal pour le comportement et pour l'aide au génotypage. Damien, je tiens aussi à te remercier pour avoir toujours répondu à mes milliers de mails pleins de questions !

Enfin, à ma famille...

Merci à mes parents, à Luc, et surtout à ma mère, pour m'avoir soutenu tout au long de ce projet et notamment au moment fatidique de la rédaction et de la préparation de la soutenance ! Ta présence auprès d'Elisa et moi a grandement participé à l'aboutissement de ce manuscrit, sans parler des petits plats en direct à domicile ! Merci d'avoir transformé les bureaux d'Océane en une exceptionnelle crèche, dont je remercie tout le personnel !!!

Merci à mon frérot qui était prêt à venir dormir sur mon canapé pour me faire les courses et le goûter pendant ma rédaction (ça c'est du soutien familial), et à Jeanne !

Merci à toute ma belle-famille, pour avoir toujours manifesté beaucoup d'intérêt pour mon projet (bon, mais on dit que tu fais quoi ?!) et pour vous être tous impliqués également dans l'aboutissement de cette thèse en gardant ma petite choupette dès que j'en ai eu besoin. Un merci tout particulier à ma super belle-sœur Charlotte, qui a quand même transformé ses jours off en jours baby sitting, ça c'est une super tata !

Merci à mes grands-parents, oncles et tantes ! ça y est, j'ai trouvé quelque chose !!! Et attention, le rat taupe n'a qu'à bien se tenir ;) J'espère que ce manuscrit va enfin vous éclairer sur ce que j'ai fait ces trois dernières années...

Merci à Mathieu, pour m'avoir écouté me lamenter au téléphone à midi et le soir en rentrant, pour avoir suivi mes grands moments de Consécration et mes explications alambiquées sur la potentielle implication de bidule dans l'interaction machin avec force de schémas, pour s'être impliqué à fond dans toutes les problématiques de ma thèse, pour être venu jusqu'à mon labo les week-end, pour m'avoir écouté à toutes mes répétitions d'AgedBrain, pour avoir accueilli le petit Science (Oh, Science !)! Et bien sûr de t'être si bien occupé de notre petite chérie.

Je pense qu'il faut aussi remercier Elisa, pour sa participation active pendant mes dernières manipulations de thèse et pendant ma rédaction (sisi), et surtout pour avoir assuré la performance des 12h/ nuit dès son 3^{ème} mois !

À Suzette,

À Elisa,

RESUME

La Maladie d'Alzheimer Sporadique (MAS) est à ce jour la cause majoritaire de démence à travers le monde. Cette pathologie est aujourd'hui une question de santé publique avec des conséquences économiques et sociales du fait du vieillissement de la population et du coût de la prise en charge des patients. Les études visant à élucider les mécanismes moléculaires de cette maladie se basent pourtant majoritairement sur des modèles animaux de la forme familiale, qui ne représente que 2% des cas de Maladie d'Alzheimer.

La première partie de cette thèse de doctorat a eu pour objectif d'explorer de nouvelles voies de signalisation neuronales pouvant être impliquées dans la MAS. Elle a permis l'identification de nouveaux partenaires synaptiques de la protéine BIN1, dont le gène représente le second locus de susceptibilité pour la MAS après APOE.

Dans un second temps, les travaux de cette thèse ont consisté en la caractérisation d'un nouveau modèle murin de cette maladie, après les modèles APOE : une souris mimant la surexpression du gène BIN1 mise en évidence chez les patients.

Il a été possible d'inclure la protéine BIN1 dans un interactome synaptique impliqué dans la régulation de deux marqueurs majeurs de la physiopathologie de la MAS : la morphologie des épines dendritiques et la régulation du peptide amyloïde β , et de les relier à une atteinte du cortex entorhinal latéral, la première structure impactée chez les patients.

Au total, cette thèse a permis de mettre en évidence des voies de signalisation impliquées dans les phases pré-symptomatiques de la maladie. Ces voies de signalisation sont des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la Maladie d'Alzheimer Sporadique.

ABSTRACT

Late-onset Alzheimer's Disease (LOAD) is the most common form of dementia and one of the most challenging disease of modern society. Although familial Alzheimer's Disease (FAD) only account for 2% of the cases, research on the molecular basis of this pathology has mostly been performed on animal models of FAD.

The first objective of this doctoral thesis was to identify new pathways involved in LOAD physiopathology. New synaptic partners of BIN1, the second most associated locus with LOAD after APOE, have been characterized.

The second objective of this thesis was to study a new mouse model of LOAD, after APOE models: a mouse mimicking the overexpression of BIN1 found in patients.

Together, the results place BIN1 in a synaptic interactome involved in the regulation of two major hallmarks of LOAD: dendritic spine morphology and amyloid β peptide regulation. They also link BIN1 with an alteration of the Lateral Entorhinal Cortex, which is the first brain structure affected in patients.

Altogether, this doctoral thesis gives new insights on molecular pathways involved in early pathologic features of LOAD, at early presymptomatic stages of the disease, attainable by new therapeutic strategies.

Table des matières

INTRODUCTION	8
Chap. 1: La maladie d'Alzheimer, généralités	8
A. Histoire et définition.....	8
B. Epidémiologie	8
C. Clinique de la maladie d'Alzheimer	11
Chap. 2 : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer	16
A. Les lésions histologiques	16
B. Génétique de la maladie d'Alzheimer.....	27
C. Mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer	37
Chap. 3 : Les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer	41
A. Modèles de la maladie d'Alzheimer familiale	41
B. Modèles de la maladie d'Alzheimer sporadique.....	44
C. Les tests comportementaux	46
Chap. 4 : La synapse	50
A. Un peu d'Histoire.....	50
B. Les différents types de synapses chimiques	50
C. Les composantes de la synapse glutamatergique.....	51
D. La plasticité synaptique	60
Chap. 5 : BIN1	64
A. Propriétés biochimiques de BIN1	64
B. Fonctions de la protéine BIN1	67
C. Rôles possibles de BIN1 dans la maladie d'Alzheimer	73
METHODOLOGIE GENERALE	75
La Biologie des Systèmes : Définition	75
Application de la Biologie des systèmes à l'étude de la maladie d'Alzheimer	77
OBJECTIFS	78
Introduction	78
Objectifs de la thèse	79
Objectif 1 : Mise en évidence de nouvelles voies de signalisation de la protéine BIN1	79
Objectif 2 : Recherche de l'implication de BIN1 dans la pathogénicité de la maladie d'Alzheimer Sporadique	80

MATERIELS ET METHODES	81
Souris transgéniques hBIN1.....	81
Proximity Ligation Assay.....	81
Spectrométrie de masse à partir d’immunoprécipitation endogène sur synaptosomes.....	83
Microdissection laser des sous-structures de l’hippocampe et analyses microarray	84
Electrophysiologie ex vivo	85
Comportement.....	85
RESULTATS	86
PARTIE I : La souris hBIN1, modèle de la phase pré-clinique de la maladie d’Alzheimer à début tardif.....	86
Introduction	86
Article 1: BIN1 BAC transgenic mice display typical early phenotypes of presymptomatic Alzheimer’s disease	88
Discussion.....	119
PARTIE II : L’interaction BIN1-Munc18-1, implication dans la maladie d’Alzheimer.....	121
Introduction	121
Résultats.....	122
Discussion.....	124
DISCUSSION	131
Discussion de l’ensemble des résultats	131
Discussion du modèle hBIN1	132
CONCLUSION	134
DONNEES SUPPLEMENTAIRES	135
Tableaux et figures supplémentaires	135
Article 2: “Big Data” in neuroscience: open door to a more comprehensive and translational research.....	142
Article 3: Chromosome 21 large-scale yeast two-hybrid screening uncovers chromatin and synaptic complexes involved in intellectual disabilities.....	154
Article 4 : Fluorescent nanodiamond tracking reveals intraneuronal transport abnormalities induced by brain disease-related genetic risk factors	195
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	221

INTRODUCTION

Chap. 1: La maladie d'Alzheimer, généralités

A. Histoire et définition

En 1907, Aloïs Alzheimer, psychiatre et neuropathologiste allemand, rapporte dans un article (Alzheimer, 1907) le cas d'une patiente de 51 ans présentant une altération évolutive de la mémoire, une désorientation et des troubles du langage. L'étude globale du cerveau montre une atrophie diffuse et une athérosclérose des gros vaisseaux sanguins. L'étude histologique montre la présence de dégénérescences neurofibrillaires et de plaques de substance anormale disséminées dans le cerveau. Aloïs Alzheimer conclut à la découverte d'une pathologie cognitive à part entière. En 1911, l'étude d'un nouveau patient tempère cette affirmation d'un processus pathologique particulier, distinct du processus sénile (Alzheimer, 1911). De ce fait, jusqu'en 1970 la Maladie d'Alzheimer (MA) sera considérée comme une forme précoce de processus sénile (Tomlinson et al., 1970).

Aujourd'hui, la MA peut se définir comme une démence d'origine neurodégénérative, c'est-à-dire due à une perte progressive et irréversible de cellules nerveuses. Une démence est une détérioration de plusieurs fonctions cognitives induisant une perte d'autonomie et des troubles comportementaux (Tableau S1). Les patients atteints de MA présentent également un trouble précoce et évolutif de la mémoire épisodique, qui est la mémoire des événements et des faits personnellement vécus dans un contexte spatio-temporel donné. L'encodage, le stockage et la récupération de cette mémoire sont atteints (Ferri et al., 2005).

B. Epidémiologie

Les études épidémiologiques conduites au cours de ces 15 dernières années (France : étude PAQUID) estiment à environ 800 000 le nombre de patients atteints de MA. Le nombre de patients atteints de démence en 2040 est estimé à 15,9 millions, la MA représentant environ 60 % des cas de syndrome démentiel (Wu et al., 2012). A l'âge de 60 ans, on observe que l'Amérique du nord et l'Europe de l'ouest présentent la prévalence la plus élevée de démence, suivis de l'Amérique latine, puis de la Chine et de ses voisins en développement (Ferri et al., 2005). Une récente étude indique que le taux d'apparition des nouveaux cas de démence semble diminuer entre les décades 1970, 1980, 1990 et 2000 (Satizabal et al., 2016).

1. L'âge : premier facteur de risque de la maladie d'Alzheimer

Dans tous les pays, le taux d'incidence de la pathologie augmente exponentiellement avec l'âge, et plus particulièrement au-delà de 70 ans (Ferri et al., 2005; Mayeux and Stern, 2012). La compilation de

plusieurs études montre que l'incidence de MA en fonction de l'âge augmente d'environ 0,5% par année supplémentaire de 65 à 70 ans et d'environ 6 à 8% au-delà de 85 ans (Fig. 1).

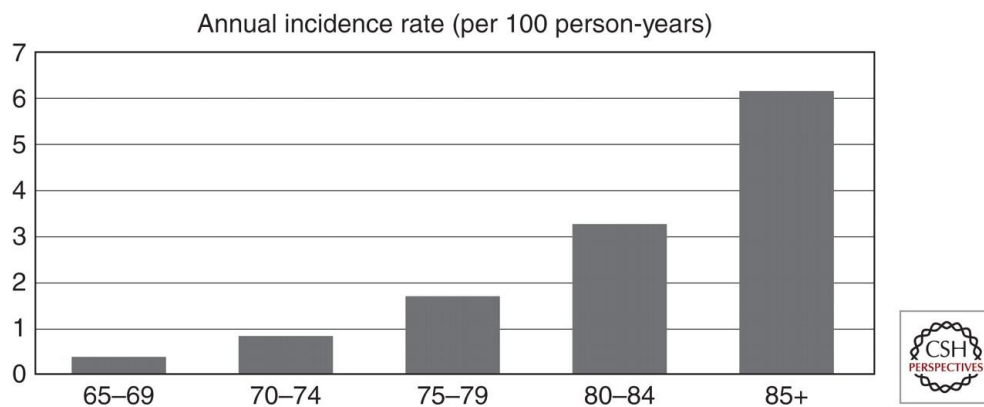


Figure 1 : Taux d'incidence de la Maladie d'Alzheimer en fonction de l'âge.

Le taux d'incidence de la MA augmente de manière exponentielle avec l'âge. Taux d'incidence pour 100 personnes et par an. D'après Mayeux & Stern, 2012.

2. *Autres facteurs de risque de la maladie d'Alzheimer*

De nombreux facteurs ont été associés au développement de la MA (Tableau 1). Parmi eux, le facteur de risque le plus important est la présence d'une pathologie cardiovasculaire ou d'un de ses facteurs de risque (diabète de type II, tabagisme, hypertension, obésité). Le niveau d'éducation, l'activité physique et le régime alimentaire seraient également des facteurs influençant la probabilité de développer une MA. Plusieurs études montrent également une tendance à une prévalence plus importante chez les femmes que chez les hommes après 80-85 ans (Tableau 2). Ceci pourrait s'expliquer en partie par la diminution post-ménopausique des œstrogènes endogènes.

Antécédent	Sens de l'influence sur la maladie
Maladie cardiovasculaire	+
Tabagisme	+
Hypertension	+ / -
Diabète type II	+
Obésité	+
Traumatisme crânien	+
Education	-
Activités de loisirs	-
Régime méditerranéen	-
Activité physique	-

Tableau 1 : Facteurs modifiant le risque de maladie d'Alzheimer.

Les pathologies cardiovasculaires ou les facteurs de risques de ces pathologies sont des facteurs de risque majeurs pour la MA. Certains modes de vie incluant une activité physique et intellectuelle régulière permettraient quant à eux de réduire le risque de développer la maladie. Adapté de la publication de Mayeux & Stern, 2012

Age	Europe		France		Italie		Etats-Unis	
	H	F	H	F	H	F	H	F
65-69	1,6	1,0	–	–	0,76	1,2	13,7	10,7
70-74	2,9	3,1	–	–	1,8	3,2	–	–
75-79	5,6	6,0	7,7	5,7	5,6	6,0	15,4	20,6
80-84	11,0	12,6	12,5	16,6	15,0	13,1	33,3	32,6
>85	18,0	25,0	23,9	38,4	23,8	34,6	42,9	50,9

Tableau 2 : Prévalence (%) de la maladie d'Alzheimer et des syndromes apparentés en fonction de l'âge et du sexe. D'après Helmer, 2006. Références des données : Europe (Lobo et al., 2000), France (Ramaroson et al., 2003), Italie (De Ronchi et al., 2005), Etats-Unis (Fitzpatrick et al., 2004).

C. Clinique de la maladie d'Alzheimer

1. Diagnostiquer la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic clinique de la MA reste à ce jour un diagnostic complexe et probabiliste. Il a pour prérequis une atteinte de la mémoire épisodique à long terme, mais d'autres troubles sont à évaluer afin d'être capable de distinguer une démence de MA d'un autre type de démence. Pour aider les soignants, des recommandations européennes ont été mises en place. Elles reposent sur l'évaluation de 6 domaines centrés sur l'évaluation des fonctions cognitives (Tableau 3) effectuée à l'aide de tests quantitatifs adaptés à chacun de ces items. Par exemple, l'efficacité cognitive globale peut être quantifiable grâce au Mini Mental State Examination (MMSE) (Folstein et al., 1975). Ce diagnostic clinique doit être complété par des examens biologiques recherchant des marqueurs de la MA.

Domaine d'évaluation	Atteintes typiques de la MA
Efficiency cognitive globale	Démence, déclin cognitif au cours du temps
Mémoire	Atteinte de la mémoire épisodique puis sémantique
Fonctions exécutives	Baisse de la fluence verbale, troubles de l'attention, difficultés d'adaptation du comportement
Troubles psycho-comportementaux	Apathie, anxiété (Tableau S1)
Activités fonctionnelles de la vie quotidienne	Perte d'autonomie (planification, organisation, anticipation, raisonnement)
Fonctions instrumentales	Troubles du langage (compréhension/expression), de la lecture, de l'écriture, des mouvements sur consigne (apraxies)

Tableau 3 : Domaines d'évaluation pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Tableau présentant les six domaines d'évaluation recommandés par les directives européennes pour diagnostiquer la MA. D'après Waldemar et al., 2007.

2. Evolution clinique de la maladie d'Alzheimer

La MA est une pathologie évolutive caractérisée par un déclin cognitif qui suit l'évolution de l'atteinte neuropathologique, notamment les dégénérescences neurofibrillaires. On peut différencier deux grands stades cliniques: le Trouble Cognitif Léger ou Mild Cognitive Impairment (MCI), et le stade démentiel de la MA.

Le MCI

Le MCI est un stade symptomatique pré-démontiel qui peut concerner tout type de démence. Il s'agit d'un stade où le patient présente des atteintes cognitives sans que celles-ci soient suffisamment importantes pour impacter les activités quotidiennes. Ainsi, tout comme le diagnostic de démence, le diagnostic de MCI repose sur des échelles quantitatives permettant d'évaluer ces atteintes. Le MCI a été catégorisé en trois types, selon le domaine cognitif impacté. Ces catégories permettent de poser un pronostic sur le type de démence sur lequel le MCI peut aboutir. Il est cependant important de noter qu'il ne s'agit que d'un pronostic probabiliste.

Le MCI amnésique : Il se définit par une atteinte isolée de la mémoire, et progresse habituellement vers une MA.

Le MCI multidomains : Il se définit par un déficit léger dans plusieurs domaines, la mémoire n'étant pas nécessairement impactée. Il peut évoluer vers une MA ou une autre forme de démence.

Le MCI *single non memory domain* : Il se définit par une atteinte isolée d'un domaine cognitif autre que la mémoire. Il n'est pas susceptible d'évoluer vers une MA mais plutôt, en fonction du domaine atteint, vers une démence fronto-temporale ou une aphasia progressive primaire.

L'Alzheimer pré-clinique

La MA évoluerait sur une dizaine d'années avant l'apparition des premiers symptômes cognitifs. Le groupe américain *National Institute on Aging, Alzheimer's Association* (NIA-AA) a ainsi défini le stade de l'Alzheimer pré-clinique, où les individus présentent un statut cognitif normal mais des biomarqueurs typiques de la maladie d'Alzheimer (Sperling et al., 2011). Le NIA-AA propose trois stades d'évolution dans l'Alzheimer pré-clinique (Fig.2) :

Stade 1 : Le patient présente une accumulation du peptide amyloïde, ou amyloïdose, détectable en imagerie PET.

Stade 2 : L'amyloïdose s'aggrave et s'accompagne d'une neurodégénération, détectable en IRM. Il y a une atrophie des lobes temporo-médians et des cortex paralimbiques et temporo-pariétaux.

Stade 3 : L'amyloïdose et la neurodégénération s'aggravent et s'accompagnent de légers troubles cognitifs qui restent cependant insuffisants pour diagnostiquer une MCI.

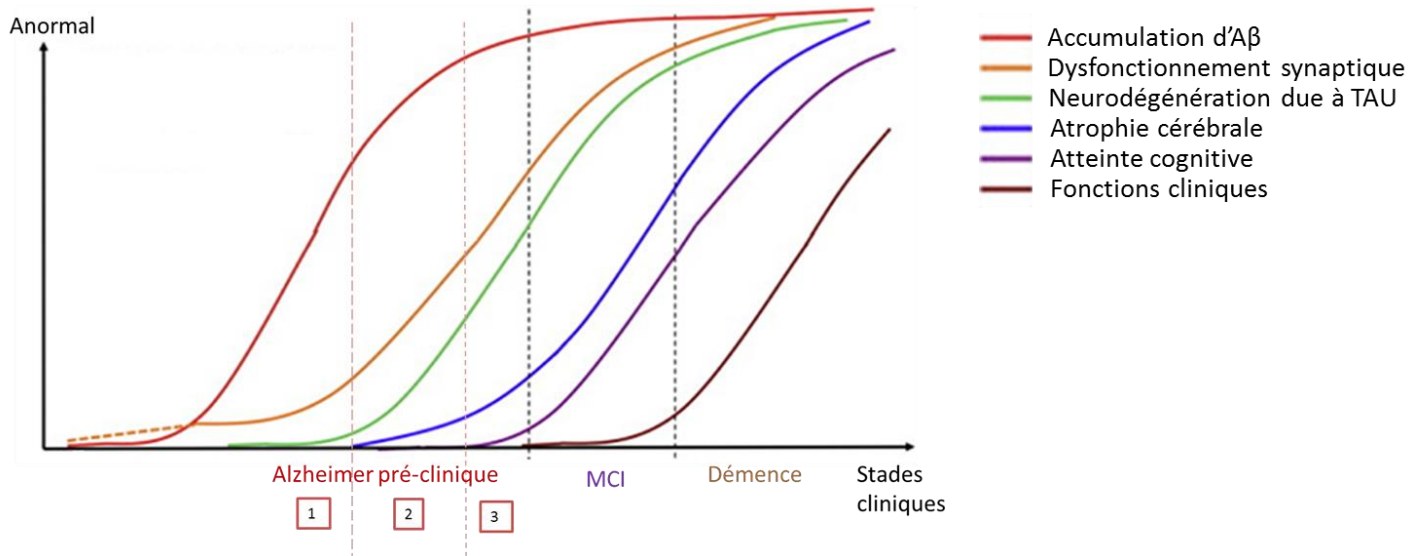


Figure 2 : Modélisation de la dynamique des biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer avec l'évolution clinique de la pathologie.

Accumulation A β : basé sur des données de dosage dans le liquide céphalorachidien (LCR) et d'imagerie PET. Dysfonctionnement synaptique : basé sur des données d'imagerie en IRM fonctionnel ou PET. Chez les porteurs de l'allèle APOE ϵ 4, cette atteinte peut précéder l'atteinte amyloïde (ligne discontinue). Neurodégénération due à TAU : basé sur des dosages dans le LCR de TAU et phospho-TAU. Atrophie cérébrale : basé sur des données d'imagerie IRM. Adapté de Sperling et al. 2011

Ces trois stades de l'Alzheimer pré-clinique ont particulièrement été mis en évidence dans le cortex entorhinal (Lue et al., 1999; Näslund et al., 2000). Cette structure de la formation hippocampique (Fig.3) est associée aux stades précoces de la maladie. En effet, plusieurs études ont montré une atteinte du cortex entorhinal chez des patients souffrant de MCI amnésique ayant évolué en MA (Gomez-Nicola et al., 2014; Whitwell et al., 2007). En 2014, Khan et son équipe ont cherché à caractériser l'atteinte du cortex entorhinal au stade pré-clinique de la MA. En utilisant des méthodes d'imagerie fonctionnelle très performante chez des individus au stade pré-clinique de la MA, et via l'utilisation de modèles souris, ils ont démontré que le cortex entorhinal latéral (LEC) et non le cortex entorhinal médian (MEC) était impacté à ce stade de la pathologie (Khan et al., 2014) (Fig. 4). Des études suggèrent que le LEC se composerait de neurones spécifiques impliqués dans la mémoire de reconnaissance (Brown and Aggleton, 2001; Tsao et al., 2013; Young et al., 1997).

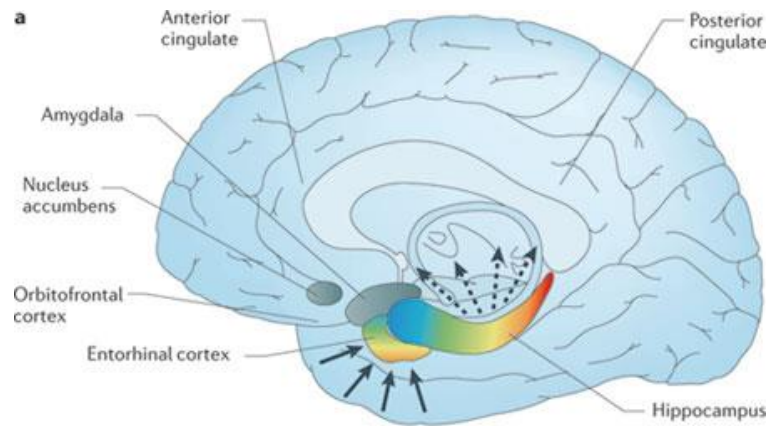


Figure 3: La formation hippocampique.

La formation hippocampique est l'ensemble comprenant le cortex entorhinal et l'hippocampe, montrés ci-dessus en couleurs. Le gradient de couleur représente l'existence d'une organisation moléculaire interne aux deux structures. Les flèches montrent schématiquement l'innervation de l'ensemble (flèche pleines) et ses projections (flèches pointillées). Small et al., 2011

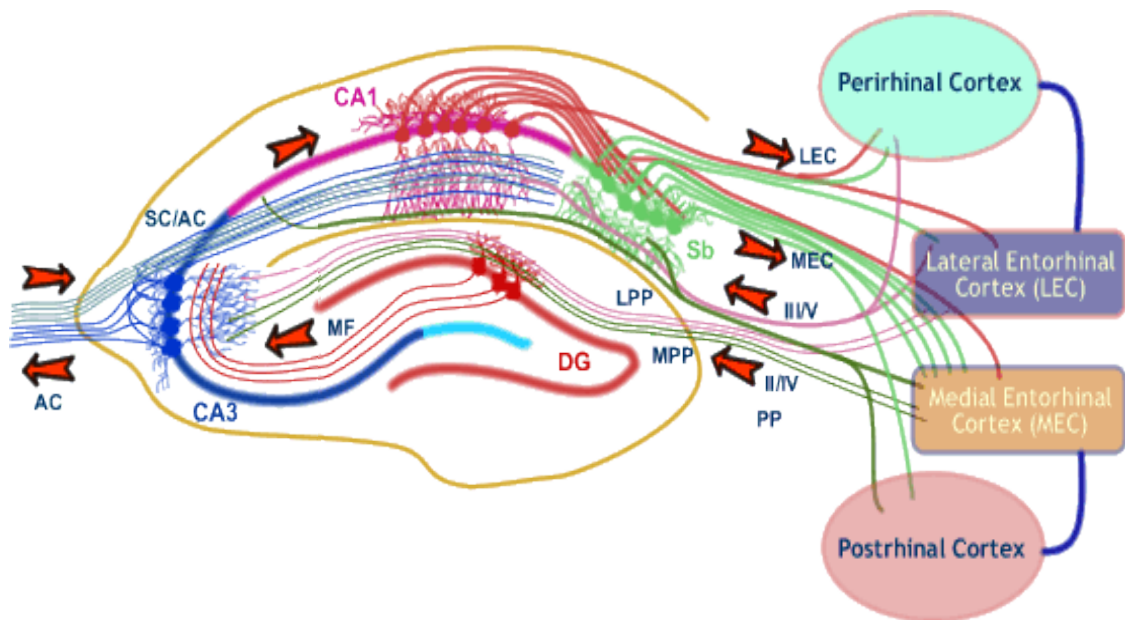


Figure 4: Connexions du cortex entorhinal et de l'hippocampe.

Le cortex entorhinal (EC) est subdivisé en cortex entorhinal latéral (LEC) et médian (MEC). L'hippocampe quant à lui est subdivisé en Gyrus Denté (DG), CA3 et CA1/CA2 (simplifié en CA1 sur ce schéma). Ces trois sous-structures de l'hippocampe reçoivent des projections provenant du CE. Le LEC projette sur le DG, le CA3 et sur la partie distale des dendrites du CA1. Cette voie transmet des informations non-spatiales à l'hippocampe (« what »). Le MEC projette sur le DG, le CA3 et sur la partie proximale des dendrites du CA1. Cette voie transmet les informations spatiales (« where »). Schéma de l'université de Bristol, Royaume-Uni.

3. Maladie d'Alzheimer et vieillissement

Si cela n'a pas toujours été le cas, il est aujourd'hui bien établi que la MA est une pathologie à part entière, distincte du vieillissement normal. Des études d'IRM fonctionnel (IRMf) ont montré que la même structure du cerveau, la formation hippocampique, était atteinte dans les deux processus, mais que cette atteinte ne touchait pas les mêmes sous-régions ni les mêmes voies moléculaires.

L'équipe de Scott Small a étudié les IRMf d'individus sains le long de leur vie (Small et al., 2002) et a comparé les résultats obtenus à ceux de singes rhesus (Small, 2004), de rats et de souris contrôles (Moreno et al., 2007). Ces études ont montré que la région la plus touchée par le vieillissement normal serait le gyrus denté tandis que la plus résistante serait le cortex entorhinal : la structure la plus précocement touchée chez les patients atteints de MA (Fig. 5). Ce résultat a été renforcé par des tests cognitifs mettant en jeu l'une ou l'autre de ces deux structures. Il a ainsi été montré que la séparation de pattern, une capacité dépendante du gyrus denté (Yassa and Stark, 2011), était atteinte chez les individus vieillissants (Gracian et al., 2013; Holden, 2012; Yassa et al., 2011). Ceci serait due à une perte d'interneurones (West, 1993).

L'atteinte du cortex entorhinal dans la MA serait quant à elle due à un dysfonctionnement du système endosomal (Cataldo et al., 2000) et plus particulièrement du rétromère, un complexe protéique dont le rôle est d'orchestrer le transport des cargo en dehors des endosomes (Small et al., 2005). Cette atteinte est cohérente avec l'accumulation du peptide A β observée au stade préclinique de la MA qui pourrait être due à un dysfonctionnement du trafic intracellulaire de l'APP (Muratore et al., 2014).

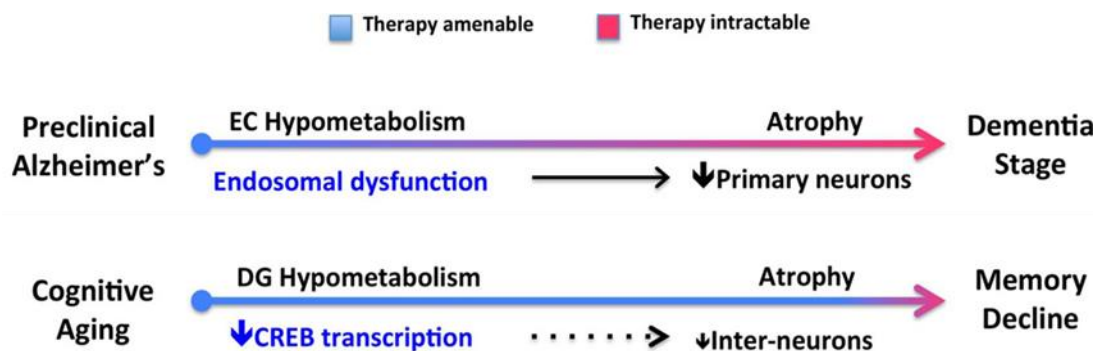


Figure 5: Progression de la physiopathologie de l'hippocampe lors de la maladie d'Alzheimer et du vieillissement normal.

La MA évolue d'un stade pré-clinique à un stade de démence. Le stade pré-clinique a été associé à un hypométabolisme du cortex entorhinal (EC) provenant d'une atteinte de système endosomal rétromère-dépendant. Le déclin cognitif du vieillissement normal a quant à lui été associé à une atteinte du Gyrus Denté (DG) dû à un défaut d'acétylation des histones dépendant de la voie CREB. Adapté de Small, 2014.

Chap. 2 : Physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

A. Les lésions histologiques

L'étude histologique post-mortem du cerveau des patients atteints de MA révèle l'existence de trois grands types de lésion: les plaques séniles (PS), les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et l'atrophie cérébrale.

1. Les plaques séniles

Lorsqu'en 1907 Aloïs Alzheimer décrit la présence de plaques de substance anormale dans le cerveau de son patient, il observe en réalité des agrégats extracellulaires composés en majorité d'une protéine appelée peptide A β , qui forme de longues fibrilles insolubles. Ces PS (Fig.6), qui sont aujourd'hui reconnues comme des lésions caractéristiques de la maladie d'Alzheimer, contiennent également d'autres molécules: de l'apolipoprotéine E (Namba et al., 1991), du fer (Collingwood et al., 2008) et des composantes de la matrice extracellulaire (Snow and Wight, 1989; Verbeek et al., 1994). Ces lésions s'étendent séquentiellement du néocortex jusqu'à l'ensemble du cerveau (Fig.7).

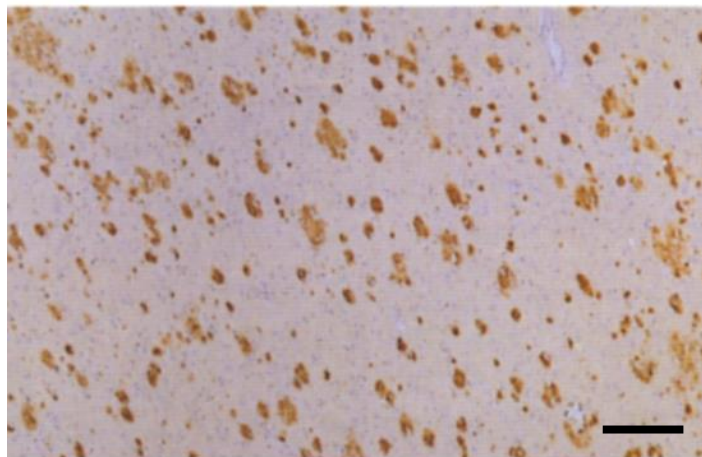


Figure 6 : Plaques séniles.

PS détectées dans le cortex post-mortem de patients atteints de MA familiale avec mutation sur le gène de l'APP. Moyen de détection : anticorps monoclonal anti-A β 42. Echelle 200 μ m. D'après Iwatsubo et al 1994.

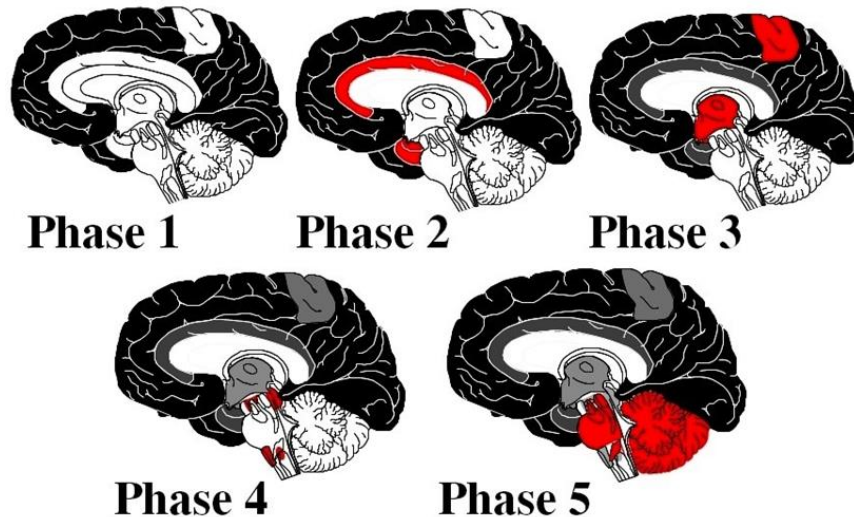


Figure 7 : Séquence des dépôts amyloïdes (Plaques Séniles).

Les dépôts de peptides Aβ s'étendent aux différentes structures du cerveau en suivant une séquence spécifique. A la phase 1, ils sont confinés au néocortex (noir). La phase 2 correspond à une atteinte supplémentaire de toutes les régions allocorticales (rouge). A la troisième phase, le cortex et le striatum sont également atteints. Les noyaux du tronc cérébral sont atteints en phase 4. Le cervelet est touché en dernier (phase 5) avec le reste des structures du cerveau. Schéma provenant des cours du Pr. Dietmar Thal.

Le peptide Aβ

Le peptide Aβ, issu du clivage du précurseur du peptide amyloïde (APP) par la β-sécrétase et la γ-sécrétase, est produit lors du métabolisme normal et aurait également un rôle physiologique. Dans le cerveau, il peut être détecté sous forme soluble ou insoluble. Chez les individus sains, 90% du peptide Aβ est sous forme soluble et 5% sous forme insoluble (Sun et al., 2015). Selon la position de l'APP sur une membrane cellulaire ou une membrane d'organite, le peptide Aβ résultant peut être libéré en extracellulaire ou en intracellulaire, respectivement. A faible concentration, ce peptide exercerait une activité neurotrophique (Yankner et al., 1990) et limiterait l'hyperactivité neuronale (Kamenetz et al., 2003).

La pathogénicité d'Aβ

- Oligomérisation et fibrillogénèse d'Aβ

Le peptide Aβ présente une capacité d'oligomérisation. Il peut ainsi être trouvé sous forme de monomères, mais également d'oligomères qui peuvent eux-mêmes s'assembler pour former des protofibrilles et des fibrilles ayant une certaine toxicité pour les cellules (Fig.8). Les fibrilles d'Aβ agrégées sont les composantes majoritaires des PS. L'existence de ces agrégats protéiques dans la MA rapproche cette maladie de l'encéphalopathie à Prion, caractérisée par une agrégation irréversible de protéines résistante à la machinerie de clairance cellulaire, et par une propagation des monomères de

cellule en cellule. Cette capacité de propagation n'est pas encore claire dans le cas de la MA mais n'est pas à exclure (Brundin et al., 2010).

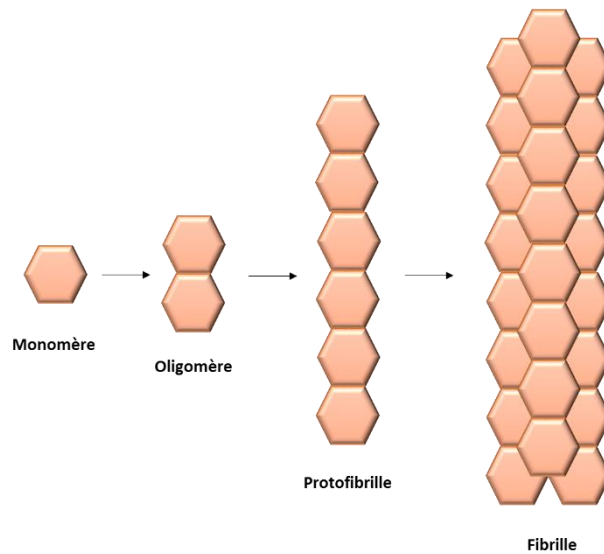


Figure 8: La fibrillogenèse du peptide Aβ.

Le peptide amyloïde β existe à différents niveaux d'oligomérisation : monomère, oligomère, protofibrille et fibrille. L'état monomérique ne présente pas de toxicité, au contraire des états oligomérique, protofibrillaire et fibrillaire. L'accumulation de ces formes jouerait un rôle majeur dans le développement de la MA. Le mécanisme conduisant à la formation des fibrilles n'est pas encore entièrement connu mais serait lié à un mauvais repliement de la protéine. Inspiré de Laferla et. al 2007.

Mécanismes de la pathogénicité d'Aβ

Des études *in vitro* ont montré que les fibrilles d'Aβ induisaient une dystrophie neuritique et une perte neuronale sur des cultures de neurones de rat, de manière cohérente avec les lésions observées chez les patients (Pike et al., 1991, 1992). Plus récemment, il a également été montré que les formes oligomériques avaient un effet toxique sur la fonction synaptique (Haass and Selkoe, 2007; Tomiyama, 2010). Cette neurotoxicité des formes insolubles et solubles d'Aβ proviendrait principalement de l'accumulation du peptide qui activerait deux mécanismes délétères pour les neurones: l'inflammation et le stress oxydant.

- Aβ et inflammation

La présence de cellules microgliales activées et d'astrocytes au voisinage des PS indique le développement d'une réponse inflammatoire associée à l'agrégation d'Aβ (Giulian, 1999). Les cellules

microgliales activées produisent en effet des molécules inflammatoires telles que les cytokines, dont le rôle initial est de protéger, mais qui peuvent être à l'origine de processus de neurodégénérescence. Les astrocytes peuvent également induire de tels processus via l'activation de voies pro-apoptotiques (Malchiodi-Albedi et al., 2001).

- **A β et stress oxydant**

Le stress oxydant est un mécanisme qui se met en place lors de l'accumulation excessive de radicaux libres dans la cellule. Ces radicaux libres sont des espèces activées de l'oxygène, comme par exemple le radical hydroxyle OH \cdot ou le monoxyde d'azote NO \cdot . A faible dose, ces molécules exercent un effet régulateur sur de nombreux mécanismes de l'organisme. Cependant, ces radicaux libres sont capables d'endommager de nombreuses autres molécules organiques. A forte dose, elles peuvent également induire des réactions inflammatoires pathologiques.

L'importance du stress oxydant dans la MA a été nettement établi (Smith et al., 2000). L'A β oligomérique soluble s'insérerait dans la membrane plasmique des neurones et cellules gliales et génèrerait la production de radicaux libres. Ceci induirait une désorganisation de la membrane plasmique, conduisant à des processus critiques tels que la perte de l'homéostasie du calcium, la perte de certaines fonctions protéiques et l'activation de processus pro-apoptotiques.

- **Autres mécanismes neurotoxiques de l'A β**

Plusieurs études tendent à montrer un effet délétère des oligomères solubles d'A β sur le fonctionnement synaptique (Fig.9). Une stimulation répétée d'une synapse telle que la collatérale de Schaffer, la synapse reliant les régions CA3 et CA1 de l'hippocampe, peut induire un mécanisme appelé Potentialisation à long terme (LTP) : une activation prolongée de la synapse. Le processus de mémorisation est dépendant de l'existence de ce processus de LTP. Il a été montré chez le rongeur que les oligomères solubles d'A β pouvaient perturber la formation de la LTP et ainsi de la mémoire (Cleary et al., 2005; Kamenetz et al., 2003; Walsh et al., 2002). En 2005, L'équipe de Paul Greengard a proposé un mécanisme moléculaire expliquant cet effet. Via l'utilisation d'approches in vitro sur des cultures primaires de neurones de souris, ils démontrent que l'application du peptide induit une baisse de la quantité de récepteurs glutamatergiques NMDA à la synapse, récepteurs essentiels à la LTP. Cette baisse proviendrait de l'interaction d'A β avec des protéines régulatrices de l'endocytose de ces récepteurs : en interagissant avec le récepteur nicotinique α -7, A β induirait une cascade de signalisation ayant pour effet la déphosphorylation des récepteurs NMDA et ainsi leur endocytose via des mécanismes clathrine-dépendants (Snyder et al., 2005).

L'accumulation du peptide A β dans les neurones pourrait également être à l'origine d'inhibition du système ubiquitine-protéasome (Almeida et al., 2006) et de dysfonctionnements de la fonction mitochondriale (Caspersen et al., 2005): des processus neurotoxiques.

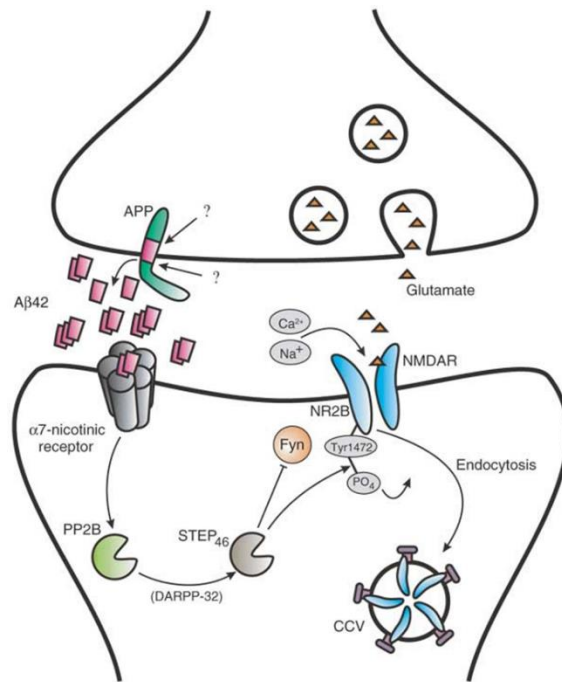


Figure 9: Aβ42 induit l'endocytose des récepteurs NMDA et réduit leur densité à la synapse

Suite au clivage de l'APP membranaire, l'Aβ42 peut être secrété au niveau de la fente synaptique. Il peut alors se fixer aux récepteurs nicotiniens α-7 post-synaptiques et induire une cascade de signalisation induisant la déphosphorylation de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA. Ce phénomène induirait l'endocytose des récepteurs par un mécanisme clathrine-dépendant. Ainsi, une surproduction d'Aβ42 conduit à une baisse de la densité de récepteurs NMDA synaptiques et donc à une baisse de la transmission glutamatergique, altérant la plasticité synaptique. D'après Tanzi, 2005.

2. Les dégénérescences neurofibrillaires

Les faisceaux neurofibrillaires décrits en 1907 par Aloïs Alzheimer ont largement été confirmés comme étant des lésions histologiques typiques de la MA, au même titre que les PS. Ces faisceaux sont aujourd'hui appelés des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) (Fig.10).

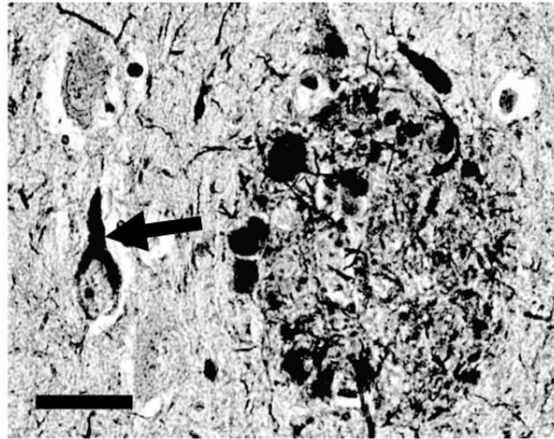


Figure 10: Dégénérescence neurofibrillaire.

La DNF est désignée par la flèche noire. La plaque ovale située à droite de la DNF est une PS. Technique de marquage Bielschowsky à imprégnation d'argent. Echelle 50 µm. D'après Nelson et. al, 2011.

L'apparition des neurofibrilles suit une séquence spatio-temporelle caractéristique (Braak and Braak, 1991; Duyckaerts et al., 1998) qui présente une corrélation avec la progression clinique de la maladie. La dégénérescence neurofibrillaire commence dans le cortex trans-entorhinal, puis évolue vers l'hippocampe, le cortex temporal, et les cortex polymodal et unimodal. Au dernier stade, toutes les régions du cerveau sont affectées par les DNFs (Fig.11). Au niveau cellulaire, ces lésions sont retrouvées dans le cytoplasme des neurones sous forme de dépôts filamenteux. Elles sont constituées de paires de filaments appariés en hélice (PHF pour « paired helical filaments »), dont le constituant principal est la protéine TAU.

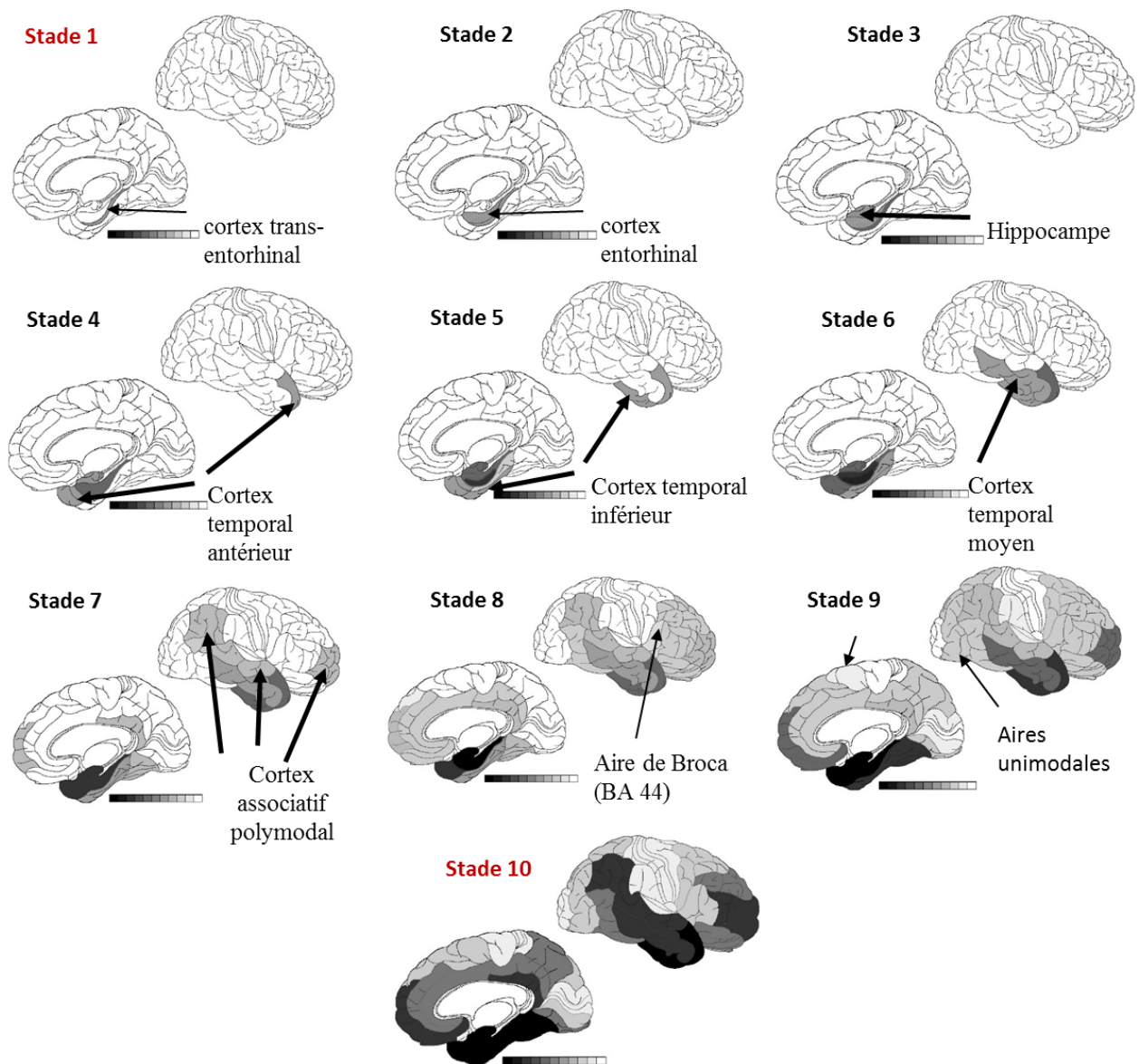


Figure 11 : Evolution des zones affectées par la dégénérescence neurofibrillaire dans la maladie d'Alzheimer. Comme pour les PS, les DNF s'étendent séquentiellement aux différentes structures du cerveau, mais cette séquence est différente. Les premières structures atteintes sont les cortex trans-entorhinal (stade 1) et entorhinal (stade 2). L'atteinte évolue ensuite vers l'hippocampe (stade 3) et le cortex temporal (stade 4, 5 et 6). Le cortex polymodal (stade 7), l'aire de Broca (stade 8) et les aires unimodales (stade 9) sont ensuite touchées. Au dernier stade, toutes les régions du cerveau sont affectées par les DNFs (stade 10).

Mécanismes de neurotoxicité de TAU

A ce jour, aucune mutation sur le gène TAU n'a été liée à la MA. Cependant, un certain nombre de mutations du gène TAU sont à l'origine de processus neurodégénératifs et du développement de démences (Hutton et al., 1998; Spire-Jones et al., 2009), suggérant qu'une modification de TAU peut être suffisante pour induire une neurotoxicité. De plus, l'évolution des DNF dans la MA corrèle mieux que les PS avec l'évolution de la maladie (Giannakopoulos et al., 2003; Gómez-Isla et al., 1997).

- Neurotoxicité des DNFs

Dans la MA, la bonne balance phosphorylation/déphosphorylation de TAU semble dérégulée, conduisant à une sur-phosphorylation de l'ensemble des isoformes de TAU (Buée and Delacourte, 2006) (Fig. 12b).

A l'état physiologique et normalement phosphorylé, TAU est une protéine hautement soluble. Cependant, lorsque cette protéine est hyperphosphorylée, elle peut s'organiser en neurofibrilles qui sont à l'origine des DNFs. Ces neurofibrilles ont dans un premier temps été considérées comme étant la cause principale de la neurotoxicité de TAU (Iqbal et al., 2000). Depuis, plusieurs études ont cependant montré que, bien que nocives, elles ne représentent pas la forme la plus toxique de la protéine.

- Neurotoxicité des formes solubles de TAU

Plusieurs études suggèrent que la neurotoxicité de TAU ne serait pas seulement due aux DNFs mais principalement aux formes hyperphosphorylées solubles (Andorfer et al., 2005; Polydoro et al., 2014; Van der Jeugd et al., 2012). Le décrochement de TAU des microtubules conduirait à une altération du processus de transport des vésicules le long des microtubules, et ainsi à des altérations du relargage des vésicules de neurotransmetteurs par la partie pré-synaptique (Moreno et al., 2011). L'excès de TAU libre pourrait également se localiser de manière anormale au niveau des dendrites et des épines, conduisant à une modification de leur cytosquelette (Zempel et al., 2010), et à une atteinte des récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA (Hoover et al., 2010). Enfin, la présence de TAU dans les dendrites et les épines serait un médiateur de la toxicité A β (Ittner et al., 2010; Roberson et al., 2007). Plusieurs travaux tendent à montrer qu'une plus faible expression de TAU pourrait être protectrice contre la toxicité A β (Rapoport et al., 2002; Roberson et al., 2007; Santacruz et al., 2005), tandis qu'une surexpression de la protéine conduirait à une augmentation de cette toxicité (Sotiropoulos et al., 2008).

3. *L'atrophie cérébrale*

Aspect anatomique

Le profil d'atrophie cérébrale de la MA est aujourd'hui bien décrit grâce à l'imagerie à résonance magnétique (IRM) anatomique. Cette technique d'imagerie cérébrale permet d'étudier les modifications de densité et de volume de la substance grise à partir d'images anatomiques. Elle a permis de mettre en évidence une atrophie du lobe temporal interne et plus particulièrement de l'hippocampe et du cortex entorhinal (Chetelat and Baron, 2003). Les premières études utilisant l'IRM anatomique montrent une perte de 40% du volume de l'hippocampe chez les patients par rapport à des individus sains du même âge (Seab et al., 1988). Depuis, plusieurs études ont confirmé cette atrophie de la région hippocampique et parahippocampique en l'estimant à un taux de 25 à 52% (Mega et al., 2000). Cette atrophie a été corrélée aux troubles de la mémoire épisodique (Lehéricy and Marsault, 2005). L'IRM anatomique ne permet cependant que d'étudier une région ciblée. Une autre technique d'imagerie, la « voxel based morphometry » (VBM) a été développée afin d'étudier de manière reproductible l'atrophie dans l'ensemble du cerveau. Cette technique a permis de montrer qu'à des stades légers de la maladie, l'atrophie touche déjà l'hippocampe, le gyrus parahippocampique (et particulièrement le cortex entorhinal) et l'amygdale. A des stades plus avancés, le cortex temporo-pariétal, le cortex cingulaire postérieur et le précunéus, le cortex cingulaire antérieur ainsi que le cortex frontal sont atteints (Baron et al., 2001) (Fig.13). L'atrophie évolue ainsi avec la sévérité de la MA, du lobe temporal interne au néocortex, de façon superposable à la progression topographique des DNF.

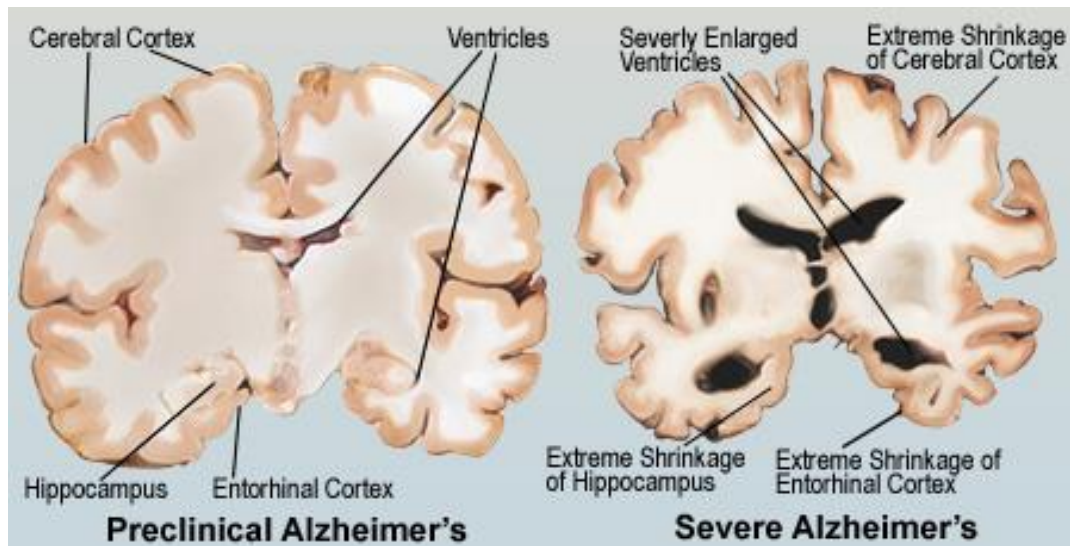


Figure 13: Evolution de l'atrophie du cerveau des patients atteints de maladie d'Alzheimer

Le processus physiopathologique de la MA évolue sur une dizaine d'années avant l'apparition des symptômes cliniques. Durant cette période appelée stade pré-clinique, les lésions de type PS et DNF évoluent notamment au niveau du cortex entorhinal et de l'hippocampe. L'évolution de la maladie conduit à un dysfonctionnement synaptique puis neuronal responsable d'une mort neuronale et ainsi d'une atrophie du cerveau. Au stade le plus avancé de la maladie, le cortex entorhinal et l'hippocampe mais également plusieurs régions du cortex (temporo-pariétal, cingulaire postérieur et antérieur, précunéus, et frontal) sont atteintes. D'après la National Institute on Aging/National Institutes of Health. <http://memory.ucsf.edu/education/diseases/alzheimer>

Aspect métabolique

La tomographie par émission (TE) est une technique qui permet de mesurer les paramètres variant avec l'activité neuronale. Les deux principales techniques de TE qui sont actuellement utilisées sont la tomographie par émission de simples photons (TEMP) et la tomographie par émission de positons au 18-fluorodésoxyglucose (TEP-FDG). Elles permettent respectivement d'étudier le débit sanguin cérébral et le métabolisme cérébral du glucose. Ces techniques ont permis de mettre en évidence un hypométabolisme du cortex cingulaire postérieur et du cortex temporo-pariétal à des stades légers, puis du cortex frontal aux stades plus avancés de la MA (Mosconi, 2005). Aux stades précoces de la maladie, cette atteinte métabolique contraste donc avec l'atteinte atrophique de l'hippocampe et du gyrus parahippocampique. Ceci pourrait être dû à des phénomènes de compensations fonctionnelles ou de dysconnexions (Chételat et al., 2006).

Aspect connectivités cérébrales

L'étude des connectivités entre structures s'effectue à l'aide de l'IRM fonctionnelle au repos (ou IRMf « resting stage »), c'est-à-dire une IRM fonctionnelle pendant laquelle le patient n'est pas stimulé par

un paradigme. En comparant la consommation d'oxygène du sang entre deux structures d'intérêt, on évalue leur connectivité. En 2012, Brier et son équipe ont ainsi montré une atteinte des connectivités fonctionnelles évoluant avec l'aggravation de la maladie (Brier et al., 2012). Dès les stades précoces de la MA, ils observent une perte de corrélation entre les cortex cingulaire postérieur et préfrontal médian ainsi qu'entre les cortex temporal inférieur et pariétal latéral.

4. Atteinte hippocampique et maladie d'Alzheimer

L'Hippocampe apparaît ainsi comme une structure majeure de la pathophysiologie de la MA. Au niveau moléculaire, c'est une des premières structures atteintes par les DNF. Au niveau anatomique, les patients souffrant de MA présentent une atrophie hippocampique mise en évidence grâce à l'utilisation de l'IRM. L'hippocampe présente une troisième forme d'implication dans la MA : cette structure est en effet le lieu d'une neurogenèse persistante qui a été montrée comme atteinte dans la pathologie.

Neurogenèse de l'hippocampe

A l'âge adulte, il subsiste deux zones de production de nouveaux neurones dans le cerveau : la Zone sous-ventriculaire et le Gyrus Denté de l'hippocampe. Il a été montré que l'âge et les processus de neuroinflammation et de neurodégénération avaient un effet néfaste sur cette neurogenèse adulte (Fuster-Matanzo et al., 2013). Plusieurs études tendent à montrer une atteinte de la neurogenèse chez les patients atteints de MA et chez les modèles animaux de cette pathologie. Chez les patients, l'étude de la neurogenèse adulte est complexe car elle ne peut être effectuée que sur le cerveau post-mortem. Les différentes études menées présentent des résultats variables selon la zone de neurogenèse, le niveau d'atteinte cognitive des patients et le stade de différenciation étudié (division cellulaire, survie, migration...) (Boekhoorn et al., 2006; Jin et al., 2004; Perry et al., 2012). Dans l'ensemble, les différentes études tendent à montrer que les nouveaux neurones issus du gyrus denté de l'hippocampe présentent une difficulté à devenir matures chez les patients souffrant de MA (Li et al., 2008; Taupin, 2009; Waldau and Shetty, 2008).

B. Génétique de la maladie d'Alzheimer

On distingue à ce jour une forme familiale de MA et une forme sporadique. La forme familiale, pour laquelle des mutations génétiques causales ont été identifiées, représente environ 2% de l'ensemble des formes de MA dans le monde. Comme pour les autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, les formes familiales sont les plus précoces, avec un début avant l'âge de 65 ans. La forme sporadique, qui débute après cet âge, représente ainsi la forme la plus fréquente de MA, avec environ 98% des cas atteints.

1. *Maladie d'Alzheimer familiale et mutations causales*

La MA familiale est une maladie d'origine génétique à transmission autosomale dominante. Environ 50% des cas de MA familiale ont été identifiés comme provenant d'une mutation sur un des gènes suivants: préséniline 1 (PSEN1), PSEN2, et le gène du précurseur du peptide amyloïde (APP)(Wu et al., 2012). Parmi ces patients, plus de 230 mutations ont été mises en évidence sur un de ces trois gènes (<http://alzforum.org/mutations>(Cruts et al., 2012)).

Le précurseur du peptide amyloïde

La première mutation causale de la MA fut mise en évidence sur le gène de l'APP (Goate et al., 1991). Ce gène, situé sur le chromosome 21, est composé de 18 exons (Yoshikai et al., 1990) et s'étend sur plus de 400kb (Rooke et al., 1993). Aujourd'hui, on dénombre 25 mutations pathogéniques de l'APP pour la MA, toutes situées dans les exons 16 et 17 du gène (Tableau S1). Ces exons sont ceux qui codent pour le peptide amyloïde, également appelé peptide A β (Kitaguchi et al., 1988).

- *Les rôles physiologiques de l'APP*

Le gène de l'APP est exprimé dans le cerveau mais également dans de nombreux autres tissus : thymus, cœur, muscle, poumon, rein, tissu adipeux, foie, rate, peau et intestin (Puig and Combs, 2013).

Au niveau neuronal, l'APP a particulièrement été décrit comme exprimé dans les neurites (axones et dendrites) et à proximité des synapses (Schubert et al., 1991). Au niveau cellulaire, l'APP peut être localisé dans différentes structures membranaires: la membrane cellulaire mais également celle du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi et de certains organites vésiculaires (Verbeek et al., 2002).

L'expression de l'APP est détectée très tôt durant l'embryogenèse des modèles murins, suggérant un rôle important de cette protéine lors du développement (Ott and Bullock, 2001). Des études récentes ont également montré l'importance de ce gène dans l'organisation de la structure embryonnaire chez le poisson zèbre (Joshi et al., 2009). Chez les mammifères, le rôle physiologique de l'APP a été exploré via des stratégies d'inactivation de gènes. L'APP fait partie d'une famille de protéines qui comprend également les protéines APLP1 et APLP2 (« amyloid precursor-like protein »), des protéines homologues de l'APP. L'inactivation de l'APP seul induit des altérations générales mineures (perte de poids, affaiblissement de l'activité locomotrice, inflammation) ainsi que des altérations du fonctionnement neuronal : atteinte de la transmission synaptique (Dawson et al., 1999) et des axones (Goldstein, 2012; Magara et al., 1999), qui s'accompagnent d'une perte de poids du cerveau (Magara et al., 1999). Ce phénotype relativement léger peut s'expliquer par l'existence des gènes compensatoires codant pour APLP1 et APLP2. En effet, si l'inactivation d'APLP1 ou d'APLP2 ne donne pas non plus de phénotype critique chez la souris, la double inactivation d'APLP1 ou APLP2 et d'APP

conduit à une létalité périnatale (Heber et al., 2000; von Koch et al., 1997). Après la naissance, l'APP aurait notamment un rôle dans la formation et le maintien des synapses (Tyan et al., 2012).

- **Le métabolisme de l'APP**

L'APP est une glycoprotéine ubiquitaire transmembranaire, composée d'un grand domaine extracellulaire, d'un domaine transmembranaire et d'un court domaine cytoplasmique. Cette protéine est métabolisée par deux voies distinctes : une voie non-amyloïdogène majoritaire, et une voie amyloïdogène minoritaire.

La voie non-amyloïdogène

La voie non-amyloïdogène fait intervenir l'enzyme α -sécrétase qui clive l'APP entre les résidus 16 et 17 du peptide $A\beta$ de la protéine. Ce clivage génère deux fragments : l'APP soluble α (sAPP α) extracellulaire, et le fragment C83 intramembranaire. Une seconde enzyme, la γ -sécrétase, clive ensuite le fragment C83, et libère ainsi deux nouveaux fragments : l'AICD (« APP intracellular domain ») et le P3 (Fig.14).

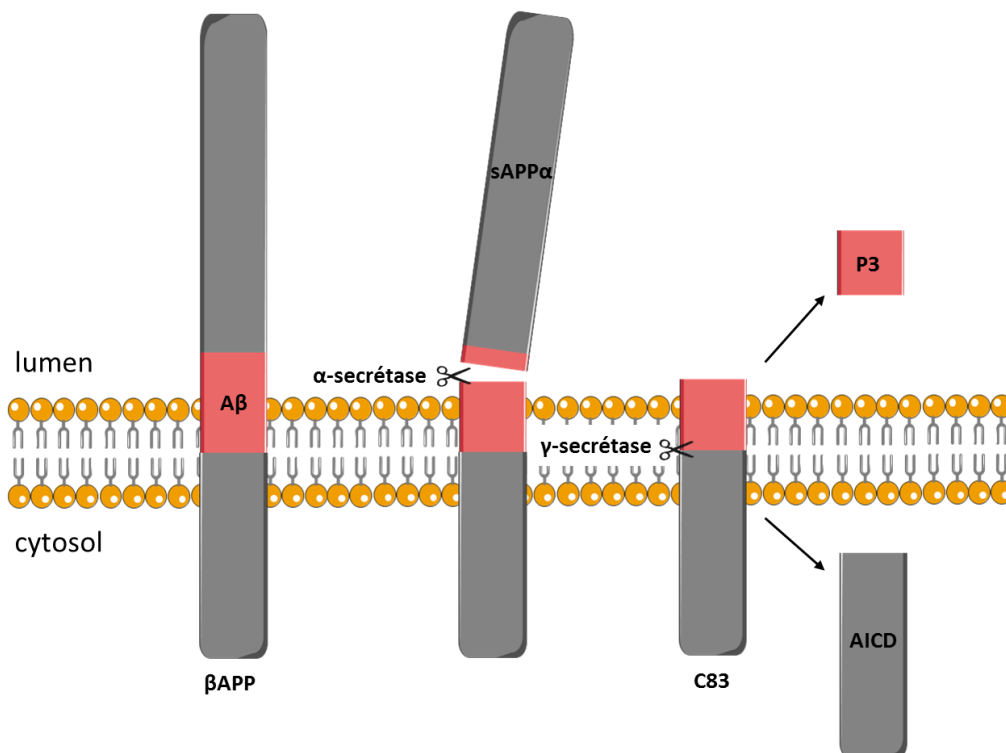


Figure 14: La voie non-amyloïdogène.

Le précurseur du peptide amyloïde (APP) est clivé par l' α -sécrétase en deux fragments : le fragment soluble α et le fragment transmembranaire C83. Ce dernier est ensuite clivé par la γ -sécrétase, libérant le fragment P3 et le domaine AICD. D'après Laferla et. al 2007.

La voie amyloïdogène

La voie amyloïdogène fait intervenir une autre enzyme : la β -secrétase, aussi appelée BACE-1 (« β -site APP-cleaving enzyme 1 »). Celle-ci clive la protéine en amont du peptide $A\beta$, conduisant à la formation d'un fragment extracellulaire sAPP β et d'un fragment intramembranaire c99. L'action de la γ -secrétase libère ensuite deux fragments : l' $A\beta$ extracellulaire et l'AICD cytosplasmique (Fig.15). La γ -secrétase peut cliver en différents sites adjacents, conduisant à une hétérogénéité de la taille du peptide $A\beta$. Chez un sujet sain, on observe environ 90% de peptides $A\beta$ de 40 acides aminés et 10% de 42 acides aminés (Seubert et al., 1992). Des formes plus longues ou plus courtes peuvent également être produites en plus faible quantité. Ces peptides ont la propriété de pouvoir s'agréger pour former les PS. La voie amyloïdogène, si elle existe à l'état physiologique, peut donc être à l'origine d'un état pathologique. Dans la majorité des cas de MA familiale, les PS sont mises en évidence dans le cerveau post-mortem. Leur composant majoritaire est le peptide $A\beta_{42}$.

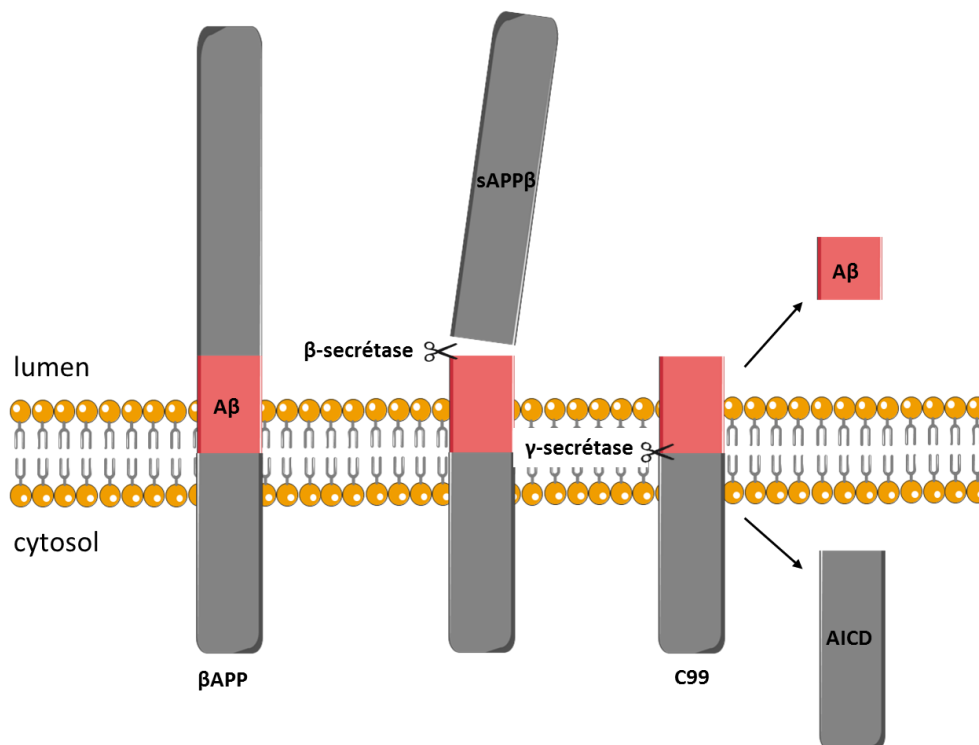


Figure 15: La voie amyloïdogène.

L'APP est clivé par la β -secrétase en deux fragments : le fragment soluble β et le fragment transmembranaire C99. Ce dernier est ensuite clivé par la γ -secrétase, libérant le fragment $A\beta$ et le domaine AICD. D'après Laferla et al 2007.

Les Présénilines

La γ -secrétase est un complexe multi-protéique de haut poids moléculaire constitué de quatre partenaires: un hétérodimère des protéines présénilines PS1 et PS2, la protéine nicastrine (NCT) et deux protéines membranaires: « anterior pharynx defective 1 » (APH-1) et « presenilin Enhancer 2 » (PEN-2). PS1 et PS2 sont des protéines transmembranaires, codées respectivement par les gènes PSEN1 et PSEN2.

- PSEN1 et PS1

Le gène PSEN1 est situé sur le chromosome 14 et code pour PS1, une protéine de 467 acides aminés. L'épissage de ce gène conduit à la formation de deux isoformes dont l'expression est ubiquitaire.

A ce jour, 233 mutations pour la MA ont été mises en évidence sur PSEN1, dont 212 clairement identifiées comme pathogéniques pour cette maladie. Ces mutations sont situées au niveau des exons 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10,11, et 12 du gène et plus rarement de certains introns (<http://alzforum.org/mutations>). De manière générale, ces mutations induisent une augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, majoritairement via l'augmentation de la production d' $A\beta_{42}$ (Ataka et al., 2004; Moehlmann et al., 2002).

- PSEN2 et PS2

Le gène PSEN2 est situé sur le chromosome 1 et code pour PS2, une protéine de 448 acides aminés. L'épissage de ce gène conduit à deux isoformes différentes de la protéine : l'isoforme 1, la plus longue, est exprimée dans le placenta, les muscles squelettiques et le cœur, tandis que l'isoforme 2 est exprimée dans le cerveau, le cœur, le placenta, le foie, les muscles squelettiques et les reins (Strooper et al., 2012).

A ce jour, 42 mutations pour la MA ont été mises en évidence sur le gène PSEN2, dont 17 clairement pathogéniques. Ces mutations ont été identifiées sur les exons 4, 5, 6, 7, 9 et 12 du gène (<http://alzforum.org/mutations>). Elles seraient pour la plupart responsables d'une augmentation de l'activité de la γ -secrétase. Des études menées sur des modèles cellulaires et animaux ont montré que certaines mutations induisaient l'augmentation de la production du peptide $A\beta_{42}$ (Citron et al., 1997). Différentes études ont également montré un impact de ces mutations sur la signalisation du calcium intracellulaire, menant à une agrégation plus importante d' $A\beta$, et à la mort neuronale (Leissring et al., 2000; Leissring, LaFerla, Callamaras, & Parker, 2001). D'autres études tendent à montrer que la PS2 serait impliquée dans des processus pro-apoptotiques. L'une d'elles a notamment montré que la mutation humaine N141I-PSEN2 induisait la voie apoptotique p53-dépendante dans la lignée cellulaire HEK293 ainsi que dans des neurones primaires murins (Alves da Costa et al., 2002).

2. *Maladie d'Alzheimer sporadique et facteurs de risques*

La forme sporadique de la MA est la forme la plus fréquente de la maladie : elle concerne environ 98% des patients. Elle est appelée « sporadique » par opposition à la forme familiale de la MA, une maladie monogénique rare à transmission autosomale dominante. Elle est également appelée maladie d'Alzheimer à début tardif (Late Onset Alzheimer Disease ; LOAD) du fait de l'âge plus avancé des patients. Le point commun de ces deux maladies est l'association d'un même type de démence à la présence de deux lésions histologiques: les PS et les DNF.

Contrairement à la MA familiale (MAF) pour laquelle des mutations causales ont été mises en évidence, les causes et les mécanismes de la MA sporadique (MAS) restent flous. Des analyses du liquide céphalo-rachidien (LCR), de données d'imagerie des PS, et de données de volumétrie de cerveaux chez des patients atteints de MAF et de MAS suggèrent des processus pathologiques communs de ces deux maladies (Bateman et al., 2012; Reiman et al., 2012). Plus récemment, des travaux menés par Beau Ances et son équipe sur les connectivités fonctionnelles dans le cerveau des patients atteints de MA ont montré une atteinte similaire dans la MAF et dans la MAS (Thomas et al., 2014). Cependant, certaines études mettent en évidence des différences entre ces deux pathologies. Une étude de 2009 montre que les patients atteints de MAF aurait un dépôt de PS plus important au niveau des ganglions de la base que les patients atteints de MAS (Villemagne et al., 2009). En 2012, une autre étude a montré des niveaux importants d'A β ₄₂ dans le LCR très précocement dans la MAF mais non dans la MAS (Reiman et al., 2012).

Facteurs de risques de la maladie d'Alzheimer : exploitation des « GWAS »

Afin d'enrichir les informations sur les causes génétiques de la MA, des études génétiques à champs large, appelées études d'association sur génome entier ou, en anglais, « Genome Wide Association Studies » (GWAS) ont été menées sur de très grandes cohortes de plusieurs milliers de patients atteints de MA par rapport à des individus sains de même âge et de même localisation géographique (pour éviter des biais de fréquence allélique). Ces études nécessitant un très grand nombre de patients sont, de fait, basées sur les informations génétiques de patients MAS, puisqu'ils représentent plus de 98% des patients atteints de MA.

Les GWAS sont basées sur la comparaison des fréquences des variations génétiques entre une population de témoins et une population de patients souffrant de la MA. Les variations les plus fréquentes sont des substitutions d'un acide nucléique par un autre, appelées polymorphismes nucléotidiques ou SNP (Single Nucleotide Polymorphism). La sur- ou la sous- représentation statistiquement significative d'un allèle dans l'une ou l'autre des populations comparées suggère l'association de cet allèle avec la maladie. La force de l'association est estimée par le calcul de l'odds-

ratio (OR), défini comme le rapport entre la proportion de sujets porteurs de l'allèle à risque chez les cas et la proportion de sujet porteurs de l'allèle à risque chez les témoins. L'OR illustre ainsi l'augmentation ($OR > 1$) ou la diminution ($OR < 1$) du risque de développer la maladie chez les sujets porteurs de l'allèle par rapport aux sujets non porteurs.

Les GWAS sont menées à l'aide de plateformes de génotypage à haut débit représentant chacun un sous-ensemble des communs connus dans le génome, permettant d'étudier le génome entier. Près d'1 million de marqueurs génétiques ont pu être testés pour des associations génétiques avec le risque de développer la MA et des endophénotypes tels que l'âge d'apparition de la maladie, des biomarqueurs, des résultats d'imagerie ou encore des effets neuropathologiques (Bertram and Tanzi, 2009; Bertram et al., 2010). A ce jour, une vingtaine de GWAS ont été effectuées afin d'identifier les déterminants génétiques de la MA (<http://www.alzgene.org>).

Le premier gène associé par méta-analyse à la MA est APOE (apolipoprotein E) (Coon et al., 2007). En 2008, ATXN1 (ataxin 1) et CD33 (siglec 3) sont également identifiés (Bertram et al., 2008). En 2009, deux études GWAS utilisant de très grandes populations cas-témoins ont identifié trois nouveaux gènes : CLU (clusterin; apolipoprotein J), CR1 (complement component (3b/4b) receptor 1), et PICALM (phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein) (Harold et al., 2009; Lambert et al., 2009). En 2010, de nouveaux gènes ont été identifiés dont le gène BIN1 (bridging integrator 1) (Seshadri et al., 2010). Enfin, en 2011, deux analyses ont identifié quatre gènes supplémentaires : CD2AP, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1 et ABCA7 (Hollingworth et al., 2011; Naj et al., 2011). De nombreuses réplifications ont été effectuées, permettant la hiérarchisation des gènes les plus associés à la MA (Tableau 4). Certains des SNPs associés à ces gènes sont considérés comme des facteurs de risque ($OR > 1$), tandis que d'autres seraient des facteurs de protection ($OR < 1$) (Tableau 4).

#	Gene	Polymorphisme	P-value	OR	Fonction(s) connue(s)
1	APOE e2/3/4	APOE_e2/3/4	<1E-50	3,685	Fixation, internalisation et catabolisme des lipoprotéines
2	BIN1	rs744373	1.59E-26	1,166	Régulation de l'endocytose des vésicules synaptiques
3	CLU	rs11136000	3.37E-23	0,879	Chaperonne. Régulation de la prolifération cellulaire
4	ABCA7	rs3764650	8.17E-22	1,229	Homéostasie des lipides. Phagocytose des cellules en voie d'apoptose par les macrophages
5	CR1	rs3818361	4.72E-21	1,174	Fixation des cellules des complexes immunitaires activant le complément
6	PICALM	rs3851179	2.85E-20	0,879	Endocytose clathrine-dépendante
7	MS4A6A	rs610932	1.81E-11	0,904	Transduction du signal
8	CD33	rs3865444	2.04E-10	0,893	Interactions cellulaires acide sialique-dépendantes
9	MS4A4E	rs670139	9.51E-10	1,079	Transduction du signal
10	CD2AP	rs9349407	2.75E-09	1,117	Molécule d'ancrage régulant l'activité du cytosquelette d'actine

Tableau 4 : Tableau des 10 gènes les plus associés à la maladie d'Alzheimer par la méthode des GWAS et de leurs SNPs les plus significatifs.

Les gènes sont ordonnés selon leur p-value, du plus au moins significatif. Trois de ces gènes sont à l'origine de protéines impliquées dans les processus d'endocytose (BIN1, PICALM et CD2AP). D'après <http://www.alzgene.org/TopResults.asp>

APOE comme facteur de risque majeur de la maladie d'Alzheimer

- Génétique d'APOE

L'implication de l'allèle APOE4 comme facteur de risque dans les formes sporadiques est connue depuis 1993 (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993a). Le gène humain APOE présente plusieurs SNPs distribués le long du gène (Nickerson et al., 2000). Les trois SNPs les plus décrits conduisent à une modification de la séquence codante et à la formation de trois isoformes différentes : APOEε2, APOEε3, et APOEε4. Les protéines résultantes ne varient que d'un ou deux acides aminés mais présentent d'importantes différences en terme de structure et de fonctions (Mahley et al., 2006). Les porteurs de la version APOEε4 présentent un risque plus élevé de développer une MAS que les individus APOEε3/APOEε3: une hétérozygotie APOEε3/APOEε4 induit un risque trois fois plus important, et une

homozygotie APOEε4 un risque dix fois plus important. APOEε2, une isoforme plus rare, a été montrée comme étant protectrice contre la MAS par rapport à APOEε3 (Corder et al., 1994). La possession de l'allèle APOEε4 représente ainsi le facteur de risque le plus important de développer une MAS (Bertram et al., 2007). Cet allèle a également été associé avec un début plus précoce de la maladie (Gomez-Isla et al., 1996; Roses, 1996).

- Rôles physiologiques d'APOE

ApoE est exprimé dans de nombreux organes, plus majoritairement dans le foie et le cerveau. Dans le cerveau, ApoE est le plus fortement exprimé par les cellules non-neuronales telles que les cellules astrocytaires et microgliales. Il a cependant été rapporté que les neurones exprimeraient également ApoE dans certaines conditions, et à un niveau plus faible (Xu et al., 2006).

ApoE est une apolipoprotéine : c'est une petite protéine sécrétée qui s'associe aux lipoprotéines chargées de transporter des molécules hydrophobes (triglycérides, cholestérol) dans le sang. Les apolipoprotéines servent de ligand pour les récepteurs des lipoprotéines auxquelles elles s'associent, rendant ainsi possible leur endocytose via ces récepteurs. Dans le cas d'ApoE, ces récepteurs sont de la famille des *Low Density Lipoprotein Receptors* (LDLR) (Fig.16). ApoE joue ainsi un rôle dans l'homéostasie des lipides et du cholestérol du système nerveux central.

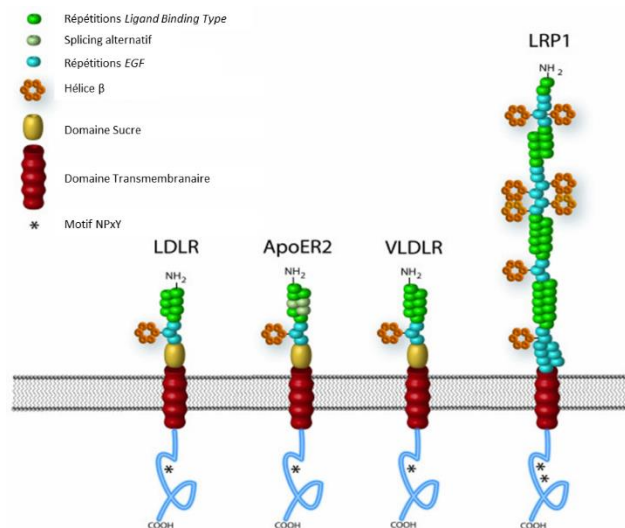


Figure 16: Les récepteurs d'APOE.

LDLR, ApoER2, VLDLR et LRP représentent les quatre principaux récepteurs d'ApoE dans le système nerveux central des mammifères. Adapté de la revue de Rebeck GW et. al.,2006.

- Pathogénicité d'APOE dans la maladie d'Alzheimer

APOE et A β

Il a depuis longtemps été montré la présence de la protéine ApoE au sein des PS chez les patients souffrant de MA (Namba et al., 1991). En 1993, W.J. Strittmatter et son équipe mettent en évidence une interaction directe entre ApoE et le peptide A β (Strittmatter et al., 1993b). Une relation entre la quantité de PS et l'allèle ApoE porté par les patients est dès lors recherchée : ApoE, en interagissant avec le peptide A β , pourrait induire un changement de conformation délétère de ce peptide. En 2004, une étude montre que les patients homozygotes pour l'allèle ϵ 4 présentent une quantité significativement plus importante de dépôts A β que les patients hétérozygotes ou non-porteurs (Tiraboschi et al., 2004). En plus de cet effet sur la fibrillogénèse d'A β , ApoE aurait un rôle dans le transport et le métabolisme du peptide. Plusieurs études in vitro rapportent qu'ApoE facilite l'internalisation de l'A β soluble dans différents types cellulaires neuronaux (Beffert et al., 1998; Cole and Ard, 2000; Yamauchi et al., 2000; Yang et al., 1997). L'effet des différentes isoformes d'ApoE sur ce phénomène reste cependant flou.

APOE et neuroinflammation

Un des traits caractéristiques de la MA est l'existence d'une neuroinflammation excessive, due à l'activation des cellules gliales (astrocytes et microglie) à proximité des PS. Cette suractivation gliale conduit à une surproduction de molécules inflammatoires pouvant induire la mort neuronale. Dans le système nerveux central, l'ApoE sécrétée provient majoritairement des cellules gliales. Il a été montré qu'A β induit l'augmentation de cette sécrétion (LaDu et al., 2000) et que les cellules gliales provenant des souris invalidées pour APOE présentent une réponse neuroinflammatoire plus importante que celles provenant de souris sauvages (LaDu et al., 2001). D'autre part, des manipulations vitro ont montré que sur des cellules gliales activées via l'A β , l'apport exogène d'ApoE humain atténue cette activation (Guo et al., 2004; Hu et al., 1998) mais sur des cellules non-activées, ApoE induit à l'inverse la production de molécules pro-inflammatoires (Guo et al., 2004). Ces données suggèrent un rôle pour ApoE dans la régulation de la neuroinflammation médiée par les cellules gliales. Des études montrent que l'isoforme ϵ 4 aurait un effet pro-inflammatoire plus important ou un effet anti-inflammatoire plus modeste que l'isoforme ϵ 3 (Barger and Harmon, 1997; Colton et al., 2004; Guo et al., 2004; Lynch et al., 2003).

APOE et métabolisme cérébral

ApoE pourrait enfin avoir un rôle dans le développement de la MA via sa fonction principale de régulation du métabolisme des lipides. APOE ϵ 4 a en effet été montré comme étant responsable d'un niveau de LDL circulant plus important, et comme étant un facteur de risque des maladies cardiovasculaire (Song et al., 2004; Wilson et al., 1994). APOE ϵ 4 étant responsable d'une augmentation

du risque d'athérosclérose (Elosua et al., 2004), cet allèle pourrait être délétère sur la fonction cérébrale via une baisse du débit sanguin.

C. Mécanismes moléculaires de la maladie d'Alzheimer

1. *L'hypothèse de la cascade amyloïde*

En 1991, Hardy et Selkoe proposent une explication du processus physiopathologique de la MA : c'est « l'hypothèse de la cascade amyloïde » (Selkoe, 1991). Selon cette hypothèse, des changements dans l'homéostasie de l'APP et/ou du peptide A β seraient à l'origine de la formation des PS et seraient suffisants pour initier la cascade moléculaire et clinique de la pathologie, incluant la TAUopathie et les DNF (Fig.17).

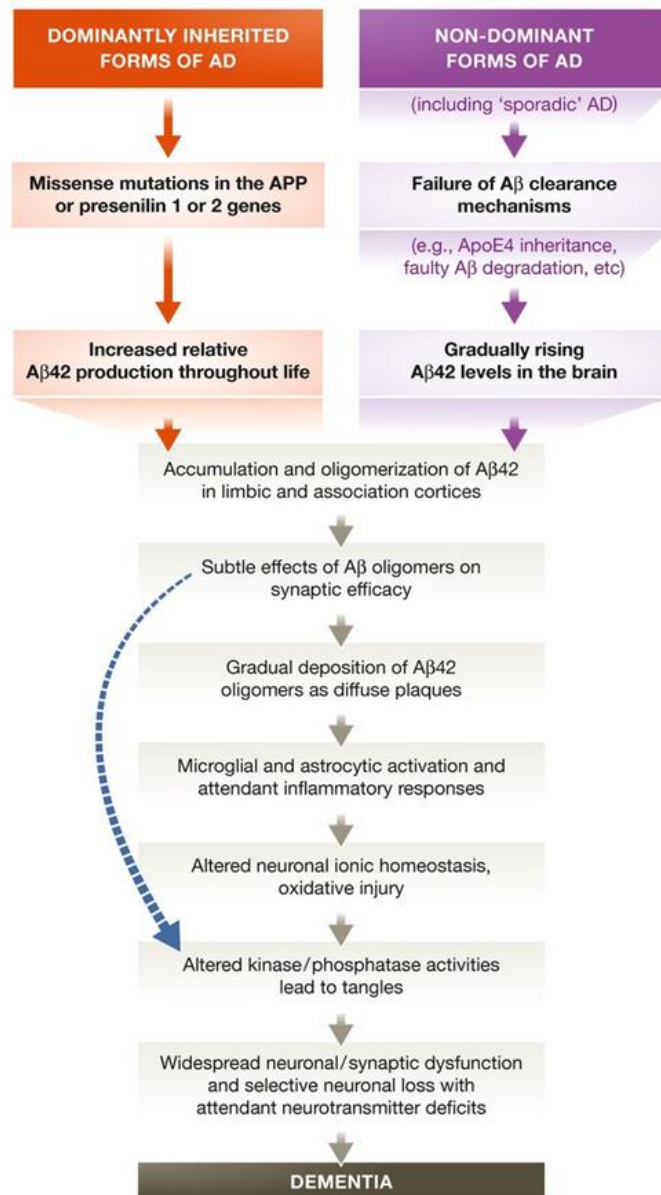


Figure 17: L'hypothèse de la cascade amyloïde.

L'accumulation et l'oligomérisation du peptide Aβ42 induit une séquence d'évènements pathologiques non réversibles amenant à un dysfonctionnement et une perte neuronale et ainsi à la démence. Selkoe & Hardy, 2016.

Hardy et Selkoe formulèrent cette hypothèse suite à la mise en évidence du gène APP sur le chromosome 21. En effet, les individus souffrant de trisomie 21, et donc ayant une copie supplémentaire du gène APP, développent systématiquement une MA. Une production trop importante du peptide A β serait à l'origine du développement de la pathologie chez ces patients (Selkoe, 1991). Cette hypothèse est renforcée par le fait que de rares individus porteurs d'une micro-duplication du gène APP seulement ne développent pas de trisomie 21 mais développent une MA précoce (Rovelet-Lecrux et al., 2006). Il a d'autre part été montré que le peptide amyloïde pouvait être impliqué dans le développement de toutes les lésions typiques de la pathologie, que ce soit les PS, les DNF ou l'atrophie cérébrale et la perte synaptique.

Peptide A β et TAU

Chez l'humain, il a été rapporté que les mutations causales de la MAF sur les gènes APP et PSEN induisent la formation des PS avant le développement des DNF dues à l'hyperphosphorylation de TAU (Hardy et al., 1998). Des mutations du gène TAU sont à l'origine de démences, mais il s'agit de démences fronto-temporales, avec présence d'agrégats de la protéine TAU mais pas de PS. Les DNF apparaîtraient donc suite aux lésions amyloïdes mais l'inverse n'est pas vrai (Hardy et al., 1998).

Peptide A β et synaptopathie

L'atrophie cérébrale et la perte synaptique font partie des caractéristiques neuropathologiques de la MA. Plusieurs études ont montré un impact du peptide A β sur la morphologie et le fonctionnement de la synapse (Cleary et al., 2005; Snyder et al., 2005). Cette atteinte synaptique est mise en évidence dès les stades précoces de la maladie, avant la perte neuronale et l'atrophie, principalement au niveau des synapses cholinergiques et glutamatergiques (Small et al., 2001). Elle serait à l'origine de la légère atteinte clinique décelée lors du stade de MCI. La plupart des souris transgéniques APP montrent une atteinte comportementale associée à une perte synaptique mais précédant l'apparition des PS, mettant ainsi en doute l'hypothèse de l'A β comme inducteur de la pathologie. Des expérimentations basées sur l'utilisation d'anticorps visant A β suggèrent cependant que des espèces solubles du peptide pourraient en être responsables (Dodart et al., 2002; Selkoe, 2002).

2. GWAS et hypothèse amyloïde

Les études de GWAS pointent trois voies de signalisation majeures comme étant impliquées dans la physiopathologie de la MA : le métabolisme des lipides, la régulation du système immunitaire, et le système endosomal de recyclage des vésicules, pour BIN1, PICALM et CD2AP (Tableau 4). Les gènes ApoE et ABCA7 codent pour des protéines impliquées dans le métabolisme des lipides. Tout comme ApoE, ABCA7 est impliquée dans le transport et le métabolisme des lipides. Elle est particulièrement exprimée dans les neurones et les cellules microgliales. Les souris invalidées pour ce gène présentent des troubles de la mémoire et leur croisement avec les modèles APP/PS1 induit une augmentation de

la quantité de PS (Sakae et al., 2016). CR1 et CD33 codent respectivement pour des protéines impliquées dans l'activation microgliale induite par l'accumulation d'A β (Crehan et al., 2013) et la phagocytose du peptide par les cellules microgliales (Griciuc et al., 2013). BIN1, PICALM et SORL1 codent pour des protéines impliquées dans le système endolysosomal. La protéine SORL1, exprimée dans les neurones, serait directement impliquée dans le trafic de l'APP. Les souris invalidées pour ce gène présentent une plus grande quantité de peptide A β dans le cerveau (Andersen et al., 2005). De même, la protéine PICALM aurait un rôle dans la régulation du peptide via l'endocytose de l'enzyme γ -secrétase (Kanatsu et al., 2014).

Chap. 3 : Les modèles animaux de la maladie d'Alzheimer

Beaucoup de modèles animaux de la MA sont basés sur la génétique des patients atteints de cette pathologie. En utilisant la souris et les connaissances de son architecture génétique, les chercheurs ont produit des modèles murins transgéniques présentant des mutations proches ou identiques de celles observées chez les patients.

A. Modèles de la maladie d'Alzheimer familiale

Malgré le caractère ambivalent des diverses études visant à comparer la MAF et la MAS, la communauté scientifique s'est largement appuyée sur la MAF afin de comprendre les mécanismes de la MAS. Pour cela, de nombreux modèles animaux ont été créés en utilisant les mutations causales de la MAF.

Aucun d'entre eux ne récapitule exactement la pathologie, mais chacun permet d'enrichir les informations sur ses mécanismes potentiels. La liste proposée ci-dessous décrit les modèles qui ont le plus été utilisés en recherche, mais n'est pas exhaustive.

1. Les modèles « APP »

PD-APP : la mutation V717F ou mutation Indiana

Considéré comme le premier modèle murin de la MA, il a été décrit en 1995 par Dora Games et son équipe (Games et al., 1995). Il s'agit d'un modèle souris exprimant un transgène d'une partie du gène APP humain avec la mutation V717F décrite chez les patients (Tableau S1): au niveau de l'exon 717 de l'APP, la valine est substituée par une Phénylalanine (Murrell et al., 1991). Le transgène est sous le contrôle du promoteur PDGF- β .

Ce modèle présente des déficits cognitifs tout au long de sa vie (de 3 à 19 mois) montrant une atteinte de la mémoire de travail (Webster et al., 2014). Ces déficits précèdent l'apparition de lésions histologiques de type PS qui apparaissent à 6 mois et dont la quantité augmente avec l'âge. Ces PS sont accompagnées d'une activation gliale et d'une atteinte neuritique, mais pas de DNF (Games et al., 1995).

APP SWE : La mutation KM670/671NL ou mutation suédoise

Diverses constructions et divers types de modèles souris ont été créés à partir de la mutation humaine KM670/671NL, communément appelée « mutation suédoise » (Tableau S1). Il s'agit d'une double mutation sur l'exon 16 de l'APP: la Lysine 670 est substituée par une Asparagine et la Méthionine 671 est substituée par une Leucine.

En 1996, Karen Hsiao et son équipe décrivent le premier de ces modèles, qu'ils appellent la Tg2576 : le gène humain muté est sous le promoteur Hamster PrP. Chez cette souris, des déficits de la mémoire de travail sont mis en évidence dès 9 mois et sont corrélés à une augmentation des peptides A β ₄₀ et

A β ₄₂. On observe des PS entourées d'une activation gliale et d'une neurodystrophie, mais pas de DNF (Hsiao et al., 1996).

Un an plus tard, une autre équipe présente un modèle souris appelé APP₂₃: le gène APP humain avec la mutation suédoise est sous le contrôle du promoteur souris Thy-1. Dès 6 mois, ce modèle présente des PS dont la quantité augmente avec l'âge et qui sont accompagnées d'une gliose et d'une neurodystrophie. Les auteurs décrivent également une augmentation du TAU phosphorylée dans le cerveau de ces souris par comparaison aux souris sauvages, et des structures ressemblant à des DNF (Sturchler-Pierrat et al., 1997). Sur ce même modèle, d'autres équipes ont montré des déficits de mémoire de reconnaissance et de mémoire spatiale dès 3 mois et de mémoire de travail dès 19 mois (Dumont et al., 2004; Lalonde et al., 2002; Prut et al., 2007).

Plus récemment, l'équipe de Takashi Saito a produit un modèle appelé APP_{NL}: ici, le gène APP souris est humanisé et les mutations humaines KM670/671NL y ont été insérées. Ceci permet d'éviter la surexpression de l'APP humain et d'observer uniquement l'effet des mutations. Ce modèle présente un ratio A β ₄₂/A β ₄₀ équivalent à celui d'une souris sauvage et ne montre pas de déficits cognitifs, même à un âge tardif (Saito et al., 2014).

Les associations de plusieurs mutations de l'APP

Afin d'essayer d'approcher au mieux la pathologie humaine, de nombreux chercheurs ont créé des modèles murins présentant une combinaison de différentes mutations du gène APP mises en évidence chez les patients atteints de MAF.

Les modèles TgCRN8 (Chishti et al., 2001) et J20 (Mucke et al., 2000) combinent tous deux la mutation suédoise à la mutation V717F, mais sous deux promoteurs différents: ceux des gènes PrP (Prion Protein) et PDGF (Platelet Derived Growth Factor) respectivement. Ces modèles présentent tous deux des déficits précoces (dès 3 mois) de mémoire de travail, de mémoire associative et de mémoire de reconnaissance. La J20 a pour particularité d'être le seul modèle à présenter ces déficits à un âge extrêmement jeune: dès 1 mois. Ces deux modèles présentent une augmentation des peptides A β ₄₀ et A β ₄₂ avec l'âge, et chez le TgCRN8 les auteurs décrivent des PS associées à une gliose et une neurodystrophie, sans DNF.

Le modèle APP_{NL-F} (Saito et al., 2014) associe la mutation suédoise à la mutation I716F, dite ibérique: sur l'exon 17, l'Isoleucine 716 est substituée à une Phénylalanine (Tableau S1). Le gène APP de souris a été humanisé et ces deux mutations humaines y ont été insérées. Ce modèle présente un déficit de mémoire de travail tardif, dès 18 mois, ainsi que des PS composées majoritairement de peptide A β ₄₂. Les PS sont observées de manière séquentielle: d'abord dans le cortex, puis dans l'hippocampe. Elles sont accompagnées d'une gliose et d'une perte synaptique mais aucune DNF n'a été mise en évidence.

Le modèle APP_{NL-F-G} (Saito et al., 2014) associe la mutation suédoise, la mutation ibérique et la mutation E693G, dite arctique: sur l'exon 17 le glutamate 693 est substitué par une glycine (Tableau S1). Ce modèle a été produit de la même manière que le modèle APP_{NL-F}. Il présente une pathologie plus précoce et plus agressive que la souris APP_{NL-F}: des PS plus précoces, plus étendues et en quantité plus importante, accompagnées d'une gliose plus marquée, et des déficits de mémoire de travail dès 6 mois.

2. Les modèles « Présénilines »

Plusieurs mutations causales de la MAF sur le gène PS1 sont des substitutions de la Méthionine 146 de l'exon 5 contre un autre acide aminé (<http://alzforum.org/mutations>). Les deux substitutions les plus décrites sont la M146V ; substitution contre une Valine, et la M146L ; substitution contre une Leucine. En 1996, Karen Duff et son équipe décrivent deux modèles souris présentant le gène humain muté avec l'une ou l'autre de ces substitutions sous contrôle du promoteur PGDF. Ils montrent notamment une augmentation d'Aβ₄₂ dans le cerveau de ces souris (Duff et al., 1996).

En 2005, une autre équipe produit une seconde version du modèle M146V, ou l'allèle humain muté est inséré dans le gène souris à la place de l'allèle endogène. Ce modèle montre une quantité plus importante de peptide Aβ₄₂ mais pas Aβ₄₀ par rapport aux souris sauvages, avec une réduction de la neurogenèse hippocampique adulte, et des atteintes évolutives de l'apprentissage et de la mémoire spatiale dès 3 mois (Sun et al., 2005).

3. Les modèles portant sur des gènes multiples

La souris APP/PS1

Ce modèle associe la mutation suédoise de l'APP à une délétion totale de l'exon 9 du gène humain PS1 (<http://alzforum.org/mutations>) sous le contrôle du promoteur souris PrP. Il a été généré et décrit par Joanna L. Jankowsky et son équipe (Jankowsky et al., 2001, 2004). En 2006, une autre équipe montre que cette souris présente une apparition de PS précoce, dès 4 mois, dont la quantité augmente progressivement jusqu'à 12 mois. Ces PS apparaissent plus tôt que chez les Tg 2576 mais avec une évolution plus progressive (Garcia-Alloza et al., 2006). Les APP/PS1 présentent des troubles de la mémoire de travail dès 3 mois (Cao et al., 2007), et de la mémoire de référence et la mémoire associative dès 6 mois (Knafo et al., 2009; Lalonde et al., 2002; Reiserer et al., 2007).

5xFAD

Ce modèle de souris associe 5 mutations causales de la MAF: trois mutations du gène de l'APP : la suédoise, la « Florida », la londonienne, et deux mutations du gène PS1: la M146L et la L286V. Il est décrit en 2006 par Holly Oakley et son équipe. La 5xFAD présente une accumulation intracellulaire précoce d'Aβ₄₂ dès 1,5 mois, suivie à 2 mois de l'apparition de PS associées à une gliose et à une perte

neuronale importante (Oakley et al., 2006). Une atteinte de la mémoire de travail, de la mémoire associative et de la mémoire de référence sont observées dès l'âge de 3 mois (Oakley et al., 2006; Ohno et al., 2006).

3xTg-AD

Ce modèle a été généré et décrit par Salvatore Oddo et son équipe en 2003. Il s'agit d'une association de deux mutations causales de la MAF, la mutation suédoise du gène de l'APP et la mutation M146V du gène PS1, avec une mutation sur le gène TAU, la P301L. Cette dernière mutation a été mise en évidence comme causale de la démence fronto-temporale, et a été associée avec la présence de formes agrégées de TAU (<http://www.alzforum.org>). Les auteurs décrivent chez cette souris des atteintes de la mémoire de 3 à 12 mois avec une apparition séquentielle: mémoire associative, mémoire de travail, de reconnaissance, et de référence (Oddo et al., 2003). Ces troubles sont accompagnés de PS et de dépôts d'A β intracellulaire dès 6 mois, et des formes agrégées de TAU hyperphosphorylées sont visibles à 15 mois. Une gliose a également été mise en évidence autour des PS.

B. Modèles de la maladie d'Alzheimer sporadique

Les modèles transgéniques pouvant être désignés comme modèles de la MAS sont, à l'heure actuelle, les modèles basés sur les résultats des GWAS Alzheimer et limités au gène *APOE*. On distingue trois types de modèles *APOE* : les souris invalidées pour le gène, dites « Knock-Out » ou KO, les souris pour lesquelles le gène *APOE* a été remplacé, dites « Knock-in » ou KI, et les souris exprimant un transgène ApoE.

1. Les souris KO APOE

Les souris invalidées pour le gène *APOE* permettent de mieux cerner le rôle physiologique d'*APOE* et son intervention dans plusieurs pathologies, dont la MA fait partie. Au niveau comportemental, ces souris présentent une anxiété plus importante que des souris sauvages à 6 et 12 mois (Raber et al., 2000a). Au niveau neuropathologique, elles présentent des dépôts diffus d'A β au niveau de l'hilus du gyrus denté de l'hippocampe mais sans PS, même à un âge avancé (Holtzman et al., 2000). Ces souris montrent également une atteinte de la neurogenèse hippocampique adulte (Li et al., 2009).

2. Les souris KI APOE

Les souris KI ApoE les plus utilisées sont des souris dont le gène *APOE* a été remplacé par les allèles humains *APOE* ϵ 3 ou *APOE* ϵ 4. En 2000, une étude montre que ces deux modèles présentent moins de dépôts A β que des souris exprimant le gène souris. Ceci suggère que l'*APOE* humain aurait un rôle positif sur la clairance d'A β (Holtzman et al., 2000). Les souris KI h*APOE* ϵ 4 présentent d'autre part une baisse de la survie des nouveaux neurones du gyrus denté provenant de la neurogenèse hippocampique adulte. Cette atteinte est due à une perte des neurones GABAergiques nécessaires à

leur survie (Li et al., 2009), et corrèle avec des déficits de mémoire et d'apprentissage (Andrews-Zwilling et al., 2010).

3. *Les souris APOE*

David M. Holtzman et son équipe ont produit en 1999 des modèles de souris transgéniques exprimant dans les astrocytes les allèles humains APOE ϵ 3 ou APOE ϵ 4 (Holtzman et al., 1999) : ce sont les GFAP-APOE. En 2001, une étude montre que les GFAP-hAPOE ϵ 4 présentent une altération de la mémoire de travail sans altération de la mémoire de référence de 11 à 14 mois. Ces souris n'ont aucune aggravation de la pathologie A β ni d'autres atteintes neuropathologiques (Hartman et al., 2001).

En 2000, une équipe a produit une souris exprimant les allèles humains APOE ϵ 3 ou APOE ϵ 4 spécifiquement dans les neurones (promoteur NSE) : ce sont les souris NSE-APOE. A 6 mois, les femelles NSE-hAPOE ϵ 4 présentent un déficit de mémoire spatiale (Morris Water Maze) que les mâles NSE-APOE ϵ 4 ne présentent pas, tout comme les femelles et les mâles NSE-hAPOE ϵ 3. Ce déficit apparaît chez le mâle NSE-hAPOE ϵ 4 s'il est croisé avec une souris hAPP, ce qui n'est pas le cas du double transgénique NSE-APOE ϵ 3/hAPP. Cette étude suggère une protection de l'allèle APOE ϵ 3 contre la pathologie A β que n'assure pas l'allèle APOE ϵ 4. Cette protection ne passe cependant pas par la réduction des PS ou de l'A β circulant, dont les niveaux sont équivalents chez les deux double-transgéniques (Raber et al., 2000b). Ces souris présenteraient d'autre part une augmentation de la phosphorylation de la protéine TAU (Brecht et al., 2004).

C. Les tests comportementaux

Ce sous-chapitre a pour but de décrire les différents tests comportementaux permettant d'évaluer la mémoire chez les rongeurs. La liste présentée ici est non-exhaustive. Les labyrinthes peuvent être utilisés de différentes manières afin d'évaluer plus précisément telle ou telle capacité cognitive de l'animal : les protocoles proposés ici peuvent être utilisés pour évaluer la mémoire chez des modèles murins de MA.

1. Le labyrinthe en Y (Y maze)

La souris est placée dans un labyrinthe en Y avec des bords hauts et opaques (Fig. 18). Ce test se base sur la curiosité et la capacité exploratoire spontanée des rongeurs, qui préfèrent normalement visiter un nouvel endroit plutôt que de retourner dans un endroit déjà connu. Pour évaluer la mémoire spatiale et la mémoire de référence, on positionne l'animal au début d'un des trois bras et, dans un premier temps, on place une récompense dans l'un des deux autres bras. On note le bras que l'animal va visiter, puis on retire l'animal. Dans un second temps, on place la récompense dans l'autre bras. On repositionne l'animal au point d'entrée, et on regarde quel bras il visite. Le bon choix est le bras avec la récompense : l'animal doit visiter le bras encore inconnu.

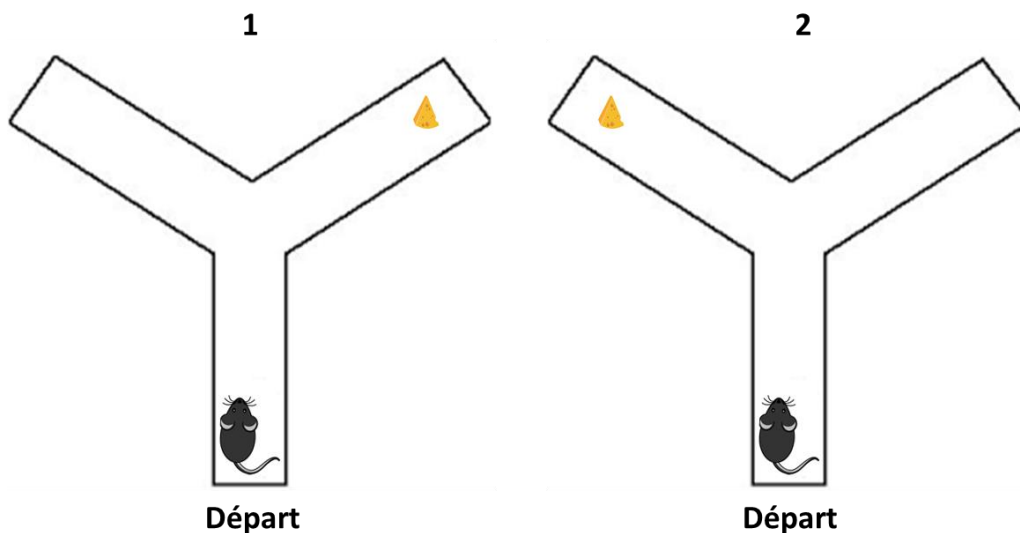


Figure 18 : Le labyrinthe en Y

Labyrinthe composé de trois bras à bords hauts et opaques formant un Y. La souris est placée au début de l'un des bras comme point de départ. Une récompense est placée dans un des deux autres bras (1), l'incitant à le visiter. La récompense est ensuite placée dans l'autre bras (2). La souris doit montrer un intérêt plus particulier pour le bras le moins visité.

2. Le test de reconnaissance d'objets (Novel Object Recognition)

Ce test, également basé sur la tendance spontanée des rongeurs à explorer leur environnement, permet d'évaluer la mémoire de reconnaissance (Ennaceur and Delacour, 1988). Cette mémoire de reconnaissance ("Quoi"?) implique le cortex perirhinal et le cortex entorhinal latéral (Brown and Aggleton, 2001). Dans un premier temps, l'animal est placé dans une arène qu'il peut visiter librement. Le jour suivant, deux objets sont placés dans l'arène (Fig. 19). On laisse l'animal visiter les deux objets puis, à un certain délai d'intervalle, on change l'un d'entre eux. On mesure alors l'exploration des deux objets, le connu et le nouveau. L'animal doit montrer une plus grande exploration du nouvel objet, montrant qu'il reconnaît l'objet inchangé et déjà exploré.

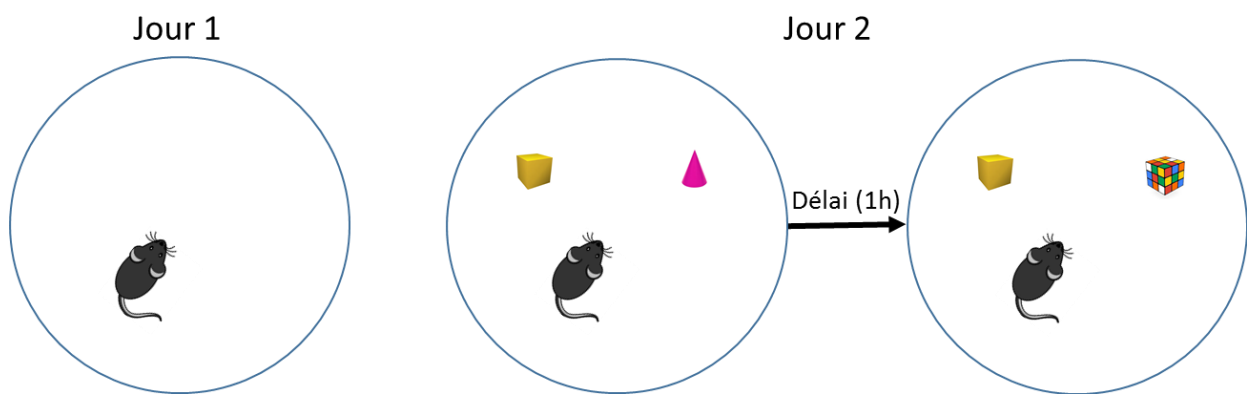


Figure 19 : Le test de reconnaissance d'objets

La souris est placée dans une arène qu'elle peut visiter librement dans un premier temps (Jour 1). Deux objets sont ensuite disposés dans l'arène et l'exploration de ces deux objets par la souris est mesurée (Jour 2). Une heure après, l'un des deux objets est changé contre un nouveau. La souris doit montrer un intérêt plus particulier pour le nouvel objet.

3. Le test de conditionnement par la peur (Fear Conditioning)

Ce test permet d'évaluer la mémoire associative et la mémoire à court et long terme. Il s'agit d'une forme de test d'apprentissage Pavlovien qui implique l'association entre des stimuli conditionnés et une conséquence aversive. La souris est placée dans une chambre avec un certain contexte (lumière). On lui fait entendre un son et, quelques secondes plus tard, elle reçoit un léger choc électrique. Après un certain délai, on la place dans la même chambre en lui faisant écouter le son sans la lumière (test de l'association avec l'indice) puis sans le son mais avec la lumière (test du cotexte) et on mesure son « freezing », comportement témoignant la peur de la souris de recevoir à nouveau le choc électrique (Fig.20). Ce test permet de différencier la mémoire dépendante de l'hippocampe (réponse au contexte) de celle qui ne l'est pas (réponse à l'indice).

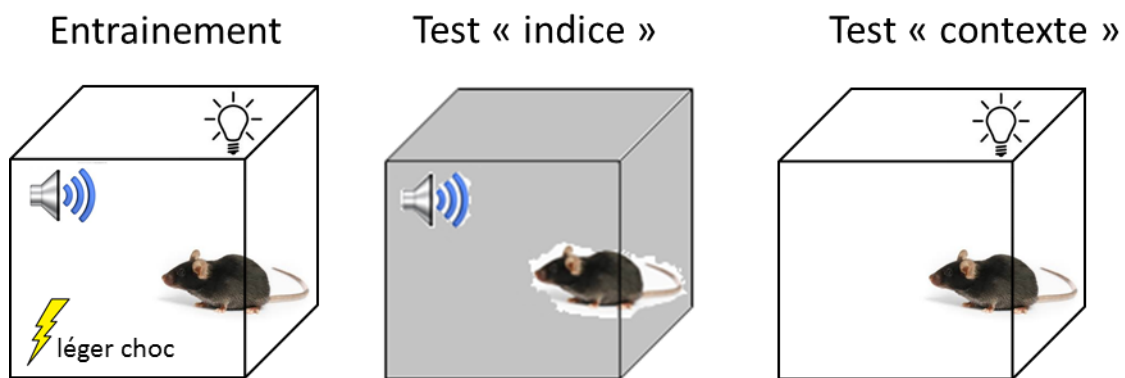


Figure 20 : Le test de conditionnement par la peur

La souris est placée dans une chambre où une lumière est allumée (contexte) et où elle entend un son (indice). Elle reçoit en parallèle un léger choc électrique aversif. On la place ensuite dans la même chambre en présence du son uniquement (test « indice »), puis de la lumière uniquement (test « contexte ») et on mesure sa réaction à chacun de ces stimuli. La souris doit montrer une réaction de peur (le « freezing ») suite à l'un ou l'autre des stimuli, montrant qu'elle l'associe au choc électrique.

4. *Le test de la piscine de Morris (Morris Water Maze)*

Ce test permet d'évaluer la mémoire spatiale, la mémoire de travail et la mémoire de reconnaissance. L'animal est placé dans une piscine dans laquelle il doit nager pour trouver une plateforme cachée (eau trouble) et sortir de l'eau. Afin que l'animal soit capable de se repérer dans l'espace et de retrouver la plateforme, des indices sont disposés autour de la piscine. On place l'animal dans les différents quadrants du bassin et on mesure le temps/ la distance mis pour rejoindre la plateforme (Fig.21). L'animal doit devenir de plus en plus performant, témoignant de sa capacité à apprendre l'emplacement de la plateforme grâce aux indices visuels. On peut ensuite retirer la plateforme et mesurer le temps passé dans chaque quadrant: l'animal doit majoritairement nager dans le quadrant qui contenait la plateforme. Ce test est très sensible pour tester la mémoire dépendante de l'hippocampe et de ses connexions avec le cortex entorhinal médian qui transmet les informations spatiales « où ? » à l'hippocampe (Fyhn et al., 2004).

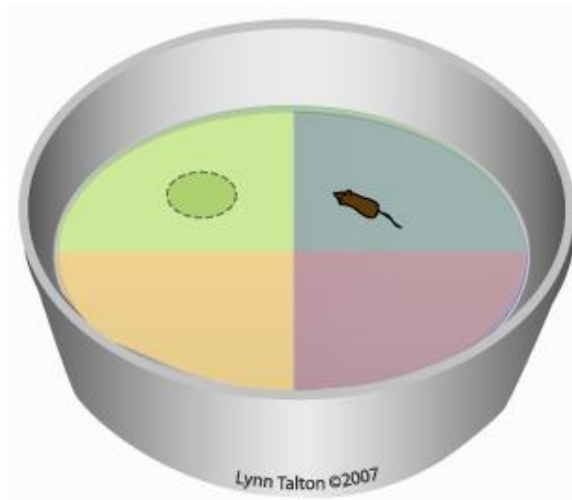


Figure 21 : La piscine de Morris

La souris est placée dans un bassin rempli d'eau où elle est obligée de nager. Dans l'un des quadrants du bassin se trouve une plateforme immergée lui permettant de se reposer. Une fois que la souris aura trouvé cette plateforme, elle la cherchera spontanément et la trouvera de plus en plus facilement (apprentissage). Des indices spatiaux dispersés autour du bassin doivent aider la souris à retrouver la plateforme. Un des tests de mémoire utilisant la piscine de Morris consiste ensuite à retirer la plateforme et à quantifier le temps passé par la souris dans chaque quadrant. La souris doit passer plus de temps dans le quadrant où se trouvait la plateforme, montrant qu'elle se souvient de sa position. Image de l'université UCLA, Behavioral Testing Core Facility.

Chap. 4 : La synapse

A. Un peu d'Histoire

La synapse est l'élément permettant la communication entre deux neurones. Son identification morphologique est due aux neuroanatomistes Rudolf Kölliker (1817–1905) et Santiago Ramon y Cajal (1852–1934). Au cours du 20^{ème} siècle, plusieurs chercheurs dont les Prix Nobels Otto Loewi (1873–1961), Henry Dale (1875–1968), Ulf von Euler (1905–1983) et Julius Axelrod (1912-2004) ont contribué à démontrer que la transmission synaptique se fait via des messagers chimiques : les neurotransmetteurs. Depuis, la recherche sur le fonctionnement synaptique a révélé que les synapses présentent une grande diversité de propriétés et une plasticité inattendue. Toutes les synapses fonctionnent selon le même mécanisme de base initialement mis en évidence par Bernard Katz (1911-2003). Un potentiel d'action arrive le long d'un axone jusqu'à la terminaison axonale, dépolarise les terminaisons nerveuses et ouvre les canaux calciques pré-synaptiques. L'influx calcique déclenche la libération du neurotransmetteur en moins d'une milliseconde (Sabatini and Regehr, 1996).

B. Les différents types de synapses chimiques

1. La synapse inhibitrice

Les synapses inhibitrices mettent en jeu deux types de neurotransmetteurs: l'acide gamma-aminobutyrique (GABA) et la glycine. Ces synapses peuvent être uniquement GABAergiques, uniquement Glycinergiques ou mixtes, c'est-à-dire présenter les deux neurotransmetteurs à la fois. Les synapses inhibitrices GABAergiques sont situées dans les réseaux corticaux supérieurs, tandis que les synapses Glycinergiques et mixtes sont essentiellement situées dans la moelle épinière. Il existe deux types de récepteurs au GABA : les récepteurs ionotropiques, situés sur la membrane post-synaptique et les récepteurs métabotropiques, situés sur la membrane pré-synaptique. Les récepteurs post-synaptiques GABAergiques sont regroupés à la membrane grâce à une protéine d'échafaudage sous-membranaire appelée géphyrine.

Les synapses GABAergiques jouent un rôle essentiel dans le développement du système nerveux central (SNC) et dans la régulation de l'excitation des réseaux neuronaux. A l'âge adulte, elles représentent environ 20% des synapses corticales.

2. La synapse excitatrice

Il existe plusieurs types de synapses excitatrices dans le SNC, pouvant mettre en jeu différents neurotransmetteurs. Des synapses excitatrices à l'AcétylCholine, à l'ATP ou à la sérotonine ont été décrites (Abreu-Villaça et al., 2011). Le neurotransmetteur excitateur majeur du SNC est le glutamate.

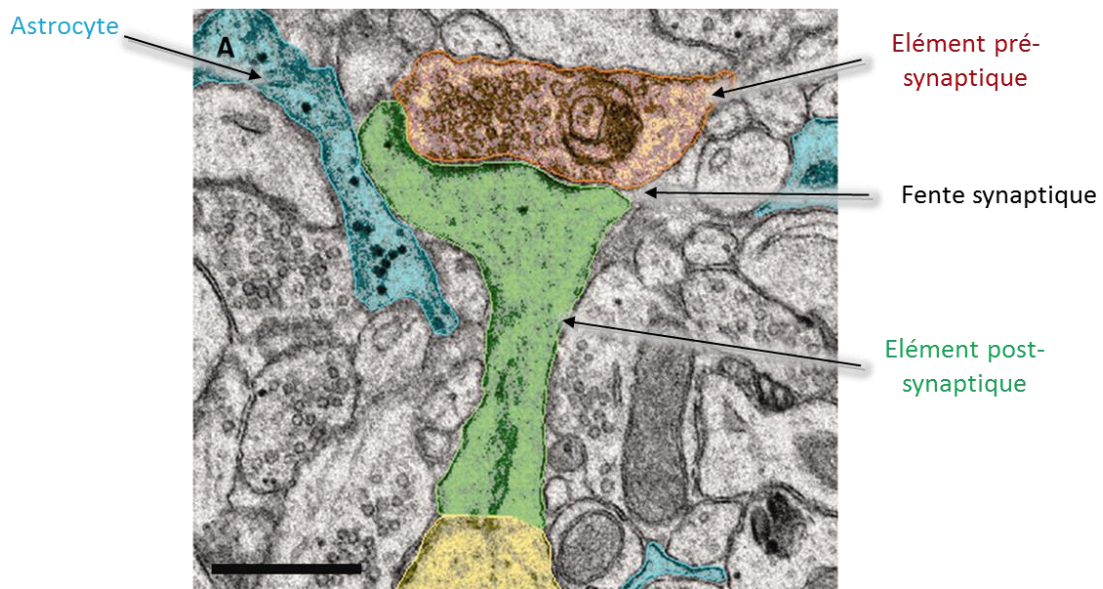


Figure 22 : La synapse tripartite.

Image de microscopie électronique provenant de la région CA1 de l'hippocampe d'un rat adulte. La partie du neurone post-synaptique est coloré en vert, la partie pré-synaptique est colorée en orange, et le pied astrocytaire en bleu. Echelle 5 µm. Adapté de Bourne et al., 2007.

C. Les composantes de la synapse glutamatergique

La synapse chimique se compose schématiquement de trois parties: la partie pré-synaptique, la fente synaptique, et la partie post-synaptique. Un partenaire non-neuronale, l'astrocyte, est également présent au niveau des synapses glutamatergiques : on parle de synapse « tripartite » (Fig.22). La pré-synapse, appelée également terminaison axonale, correspond à la partie du neurone émetteur. La post-synapse, appelée également épine dendritique, correspond à la partie du neurone récepteur. La fente synaptique est l'espace existant entre ces deux parties, dans lequel sont libérées les molécules permettant la communication entre le neurone émetteur et le neurone récepteur. Cet espace est large d'environ 10 à 20 nm. Les parties pré et post-synaptiques présentent chacune une spécialisation fonctionnelle basée sur une organisation moléculaire adaptée.

1. La terminaison axonale

La partie pré-synaptique est celle qui reçoit le potentiel d'action et le transforme en un message chimique afin de transmettre l'information à la partie post-synaptique. Elle renferme ainsi toute la machinerie nécessaire à la synthèse, au stockage, à la libération et à la régulation du glutamate.

La synthèse du glutamate

Au niveau de la terminaison axonale, le glutamate est principalement produit à partir d'un acide aminé, la glutamine. Celle-ci est produite par les astrocytes à partir du glutamate lui-même, recapté au niveau

de la fente synaptique où il a été libéré par la terminaison axonale. La glutamine est ensuite libérée par les astrocytes, recaptée par la terminaison axonale via des échangeurs couplés aux cations (Bröer and Brookes, 2001), et transformée en glutamate par la glutaminase, une enzyme mitochondriale. Une fois produit, le glutamate est chargé dans les vésicules synaptiques grâce à des transporteurs appelés VGLUT (Vesicular GLUtamate Transporter).

Les vésicules synaptiques

Les vésicules synaptiques sont de petits organites uniformes de 35 nm de diamètre contenant de fortes concentrations de neurotransmetteur. Ces vésicules sont produites à partir des endosomes ou recyclées suite à leur utilisation dans le processus d'exo/endocytose. Après avoir été chargées en glutamate, les vésicules sont transportées vers la zone active de la membrane plasmique pré-synaptique où elles pourront être recrutées pour l'exocytose. Elles s'arriment à la zone active et sont alors activées afin d'être compétentes pour la fusion membranaire dépendante du calcium intracellulaire. Après avoir libéré le glutamate dans la fente synaptique, la vésicule sera recyclée. On peut ainsi distinguer trois groupes de vésicules synaptiques: le pool compétent pour la libération, le pool de recyclage et le pool de réserve (Rizzoli and Betz, 2005). Le pool compétent est amarré à la surface, c'est le premier groupe de vésicules libérées pendant une stimulation nerveuse. Le pool de recyclage est proche de la membrane et tend à être recyclé pour des stimulations modérées ou physiologiques. Le pool de réserve constitue un stock de vésicules prêtes à être rendues compétentes. Cette organisation des vésicules synaptiques participe à la vitesse extrêmement rapide de la neurotransmission.

- #### Le recyclage des vésicules synaptiques

Le recyclage des vésicules synaptiques est un processus comprenant le retrait des composantes de la vésicule de la membrane plasmique et la régénération d'une vésicule fonctionnelle. Au moins quatre modes de recyclage ont été décrits : le « kiss-and-run » (Fesce et al., 1994), l'endocytose ultra-rapide, l'endocytose clathrine-dépendante, et l'endocytose « bulk » (Fig. 23). Ces modes diffèrent par leur rapidité, le maintien de l'intégrité des vésicules et par les molécules impliquées (Kononenko and Haucke, 2015). Le mode le plus décrit est celui de l'endocytose clathrine-dépendante. Il a été observé à la membrane plasmique pré-synaptique en bordure de la zone active (Gad et al., 2000). Des adaptateurs cytoplasmiques tels qu'AP-2, FCHo, les epsines et les intersectines initient l'assemblage du manteau de clathrine autour de la vésicule. La dynamine, une GTPase, catalysera par la suite la scission de la vésicule avec la membrane plasmique. Elle est recrutée par des protéines à domaines BAR comme l'endophiline, les amphiphysines et les syntaxines (Di Paolo et al., 2002).

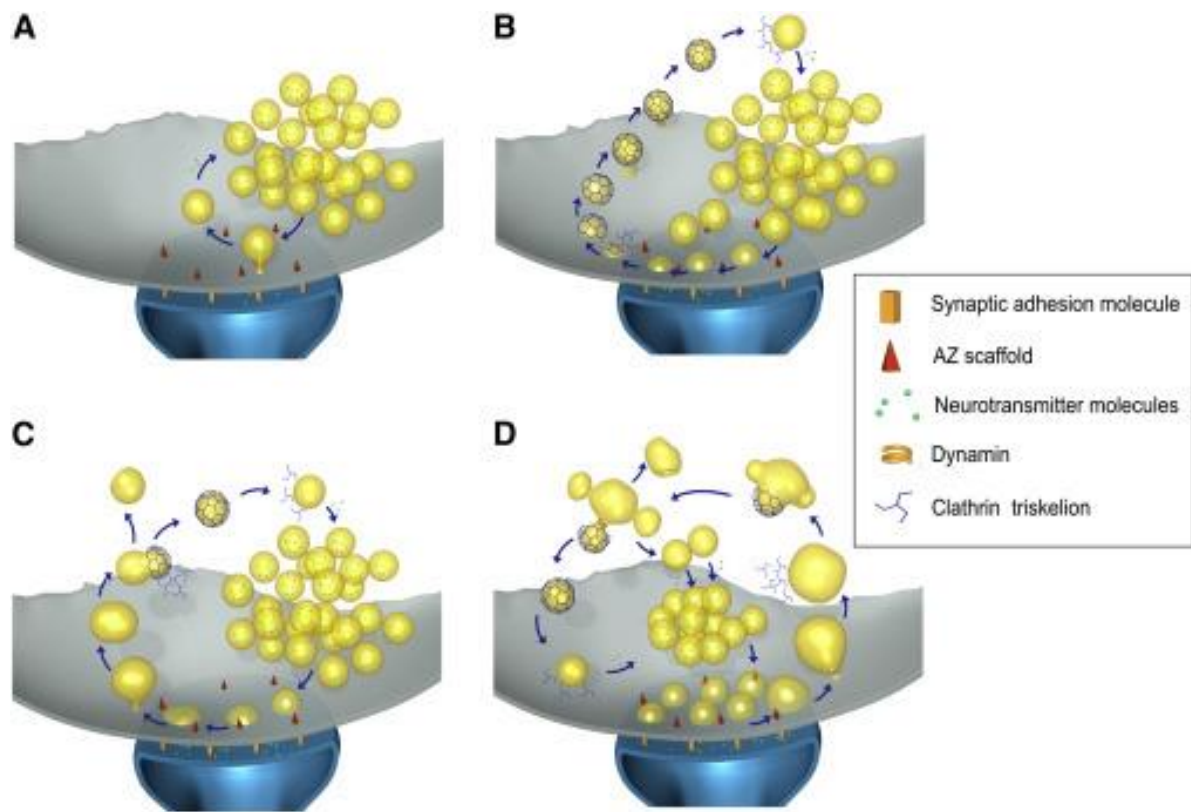


Figure 23 : Recyclage des membranes à la terminaison axonale

(A) Endocytose Kiss-and-run : la vésicule décharge son contenu via un simple pore de fusion. Celui-ci se referme ensuite et la vésicule se détache de la membrane plasmique. Elle est directement ré-utilisable : c'est un mécanisme très rapide.

(B) Endocytose clathrine-dépendante : Suite à la formation du pore de fusion, la vésicule fusionne entièrement avec la membrane plasmique. Les composants moléculaires de la vésicule sont ensuite successivement récupérés à la membrane via la formation d'un manteau de clathrine qui permet la reformation de la vésicule synaptique. La vésicule retrouve par la suite le pool des vésicules utilisables. Ce processus dure une dizaine de secondes.

(C) Endocytose ultra-rapide : Après fusion totale de la vésicule avec la membrane plasmique, il y a une invagination membranaire permettant la formation d'une vésicule synaptique élargie équivalente à environ 4 vésicules classiques. Les vésicules seraient reformées à partir de cette vésicule élargie via un mécanisme utilisant un manteau de clathrine. Ce processus peut être observé suite à un ou plusieurs potentiels d'action.

(D) Endocytose Bulk : Ce mode d'endocytose a été mis en évidence suite à une stimulation tétanique ou chimique. Il y a formation d'une grosse structure vésiculaire qui sera par la suite subdivisée en plusieurs vésicules via des mécanismes pouvant dépendre ou non du manteau de clathrine.

Adapté de Kononenk et Haucke, 2014

La zone active

La zone active correspond au site de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique pré-synaptique (Fig.24). Il s'agit donc du site de libération du glutamate dans la fente synaptique. Son organisation participe également à la vitesse de la transmission synaptique. Très précisément localisée en face des récepteurs post-synaptiques au glutamate, cette zone recrute et ancre les vésicules synaptiques aux sites de libération, leur permet de devenir compétentes, et arrime les canaux calciques près des sites d'ancrage afin d'optimiser la fusion dépendante du calcium (Südhof, 2012). Ces propriétés de la zone active sont rendues possibles par une architecture moléculaire précise.

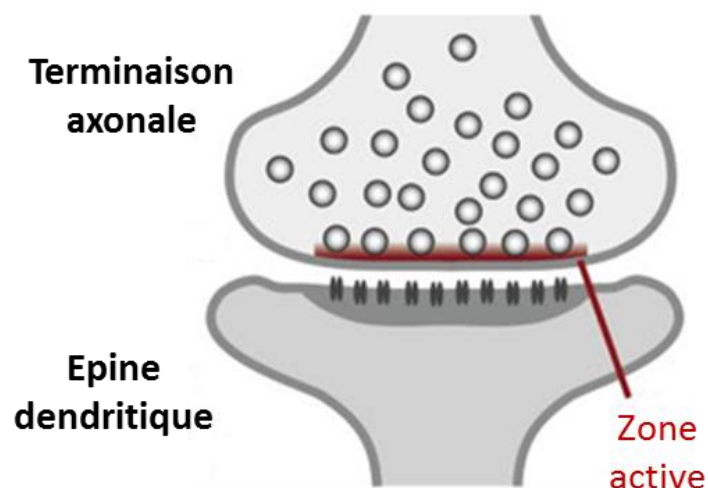


Figure 24 : La zone active

Située à la terminaison axonale, la zone active correspond au site de fusion des vésicules synaptiques avec la membrane plasmique. Une architecture moléculaire précise permet sa localisation face aux récepteurs glutamatergiques situés à la membrane de l'élément post-synaptique, optimisant ainsi la transmission synaptique. Adapté de Südhof 2012.

- La fusion membranaire : les protéines SNARE et SM

La fusion de la vésicule synaptique à la membrane plasmique est organisée par les protéines SNARE (Soluble NSF-Attachment protein REceptors) : SNAP-25, syntaxine-1 et synaptobrevine. SNAP-25 et syntaxine-1 sont ancrées à la membrane plasmique tandis que la synaptobrevine est ancrée à la membrane vésiculaire. Ces protéines travaillent de concert avec des protéines cytoplasmiques appelées SM (Sec1/Munc18-like), dont la principale est Munc18-1. Avant la fusion, la syntaxine-1 présente par défaut une conformation fermée liée à Munc18-1 (Dulubova et al., 1999). Lors de la préparation à la fusion, la syntaxine-1 passe en conformation ouverte, probablement via une action de Munc18-1 (Ma et al., 2011). En conformation ouverte, elle reste liée à Munc18-1 mais se met

également à interagir avec SNAP-25 via sa partie N-terminale (Khvotchev et al., 2007). Ce complexe se lie à la synaptobrevine accrochée à la membrane vésiculaire : c'est la formation du complexe SNARE. Suite à l'arrivée d'un potentiel d'action à la terminaison axonale, l'augmentation du calcium intracellulaire finalise enfin la fusion. Il a été montré que l'association de Munc18-1 au complexe SNARE est essentiel à ce processus (Zhou et al., 2013). Après la fusion, les vésicules sont endocytées et les complexes SNARE sont désassemblés par d'autres partenaires protéiques. Munc18-1 reste associée à la syntaxine-1 qui reprend sa conformation fermée. Ce mécanisme est celui de la libération dite évoquée du glutamate, c'est-à-dire la libération provoquée par l'arrivée d'un potentiel d'action. Le glutamate peut également être libéré de manière spontanée, via un mécanisme similaire mais impliquant des synaptobrevines différentes. La libération évoquée impliquerait la synaptobrevine 2 tandis que la libération spontanée impliquerait les synaptobrevines 4 et 7 (Kavalali, 2015).

Organisation nanoscopique de la terminaison axonale

L'élément pré-synaptique assure ainsi de nombreuses fonctions, permises par une certaine organisation moléculaire. L'équipe de S.O. Rizzoli a cherché à décrire et quantifier précisément cette architecture. A partir de méthodes de biochimie, de spectrométrie de masse, et d'imagerie haute résolution, ils ont effectué une reconstitution 3D de l'organisation des organelles et des protéines révélant la présence d'environ 300 000 protéines et 400 vésicules (Wilhelm et al., 2014) (Fig. 25). Grâce à la super-résolution, ces auteurs ont pu montrer que les molécules de la machinerie d'exocytose sont nombreuses (environ 20 000 ; 26 000 par exemple pour SNAP-25) et que les protéines de la machinerie d'endocytose sont d'un plus faible ordre de grandeur (environ 1 000 ; 1 200 pour amphiphysin-1). Le nombre de copie de chaque protéine montre que la terminaison axonale ne serait capable que de recycler simultanément 7% du pool de vésicules en se basant sur la quantité de molécules de clathrine.

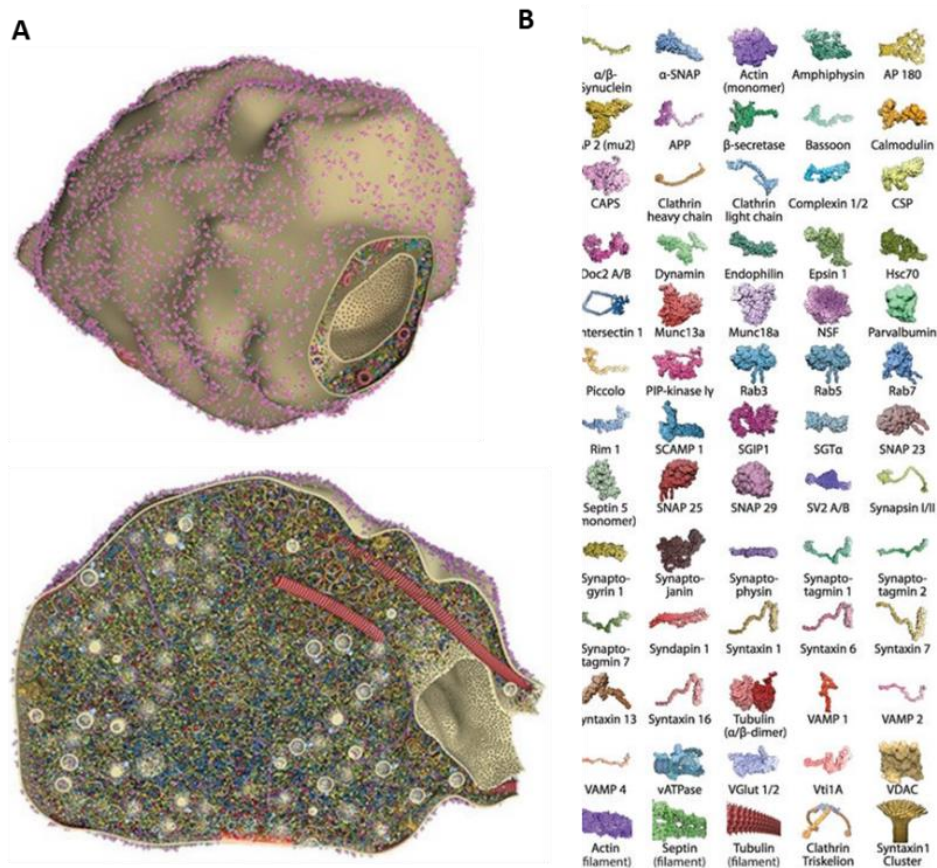


Figure 25 : Reconstitution 3D d'une terminaison axonale.

(A) Section d'un élément pré-synaptique contenant 60 protéines différentes et de multiples vésicules synaptiques. La quantité de copie pour chaque protéine et leur position ont été déterminées grâce aux données d'imagerie de super-résolution **(B)** Représentation 3D des protéines mises en évidence dans un élément pré-synaptique. Adapté de Wilhelm et al., 2014.

2. L'épine dendritique

Les épines dendritiques sont de protrusions membranaires de l'ordre du submicron, situées sur les dendrites des neurones. Ce sont des structures hétérogènes et dynamiques : leurs nombre, taille et forme varient en fonction de changements intrinsèques ou extrinsèques au neurone et selon l'activité de la synapse (Nägerl et al., 2004). Une épine dendritique peut être subdivisée en deux compartiments : la tête et le cou (Fig. 26). La taille et la composition moléculaire de chacun de ces compartiments varient également avec l'activité neuronale. A partir d'études de microscopie électronique, trois grands types de morphologie d'épines ont ainsi été définis: les filopodia, les 'stubby' et les 'mushrooms' (Fig.26). Contrairement aux 'stubby' et aux 'mushroom', les filopodia ne

présentent pas de densité post-synaptique permettant la définition d'une tête. Elles sont considérées comme des épines immatures.

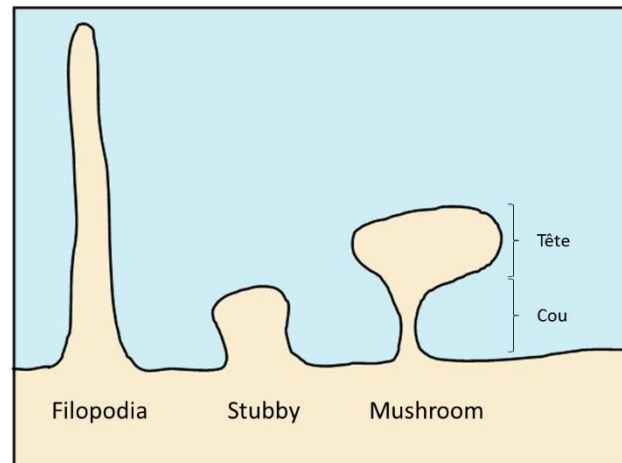


Figure 26 : les différents types de morphologie d'épines dendritiques.

Il existe trois grands types d'épines dendritiques, classées selon leur morphologie. Les filopodia sont des épines longues et fines qui ne présentent pas de densité synaptique : ce sont des épines immatures. Les stubby sont des épines matures qui ne présentent pas de cou. Les mushroom sont des épines matures pour lesquelles on distingue un cou et une tête. Adapté d'Hering et Sheng, 2001.

La densité post-synaptique

La densité post-synaptique ou PSD (PostSynaptic Density) est une structure composée de protéines membranaires et cytoplasmiques situées à la membrane plasmique post-synaptique des synapses excitatrices. Cette structure d'une épaisseur de 30 à 60 nm environ (Harris et al., 1992; Spacek and Harris, 1998) se compose d'une grande diversité de protéines, détaillées grâce à la mise en place d'expériences de biochimie et d'imagerie de plus en plus pointues. Une des premières stratégies utilisées a été la séparation des protéines par électrophorèse sur gel de polyacrylamide suivie de leur séquençage (Cotman et al., 1974). Cette méthode a permis de déterminer dès les années 1970 les composantes majeures de la PSD : protéines du cytosquelette (actine, neurofilaments), protéines de signal (calmoduline), récepteurs glutamatergiques, et protéines d'ancrage (PSD95) (Fig.27). Aujourd'hui, les méthodes d'imagerie de super-résolutions permettent non seulement de confirmer et de préciser la composition moléculaire de la PSD, mais également de quantifier cette composition et de suivre sa dynamique (Lu et al., 2014; Salvatico et al., 2015). Les stratégies d'interactomique telles que le double-hybride, la spectrométrie de masse et la Proximity Ligation Assay (PLA) permettent de plus d'identifier les interactions existant entre les composantes de la PSD (Husi et al., 2000; Kornau et al., 1995; Swiech et al., 2011).

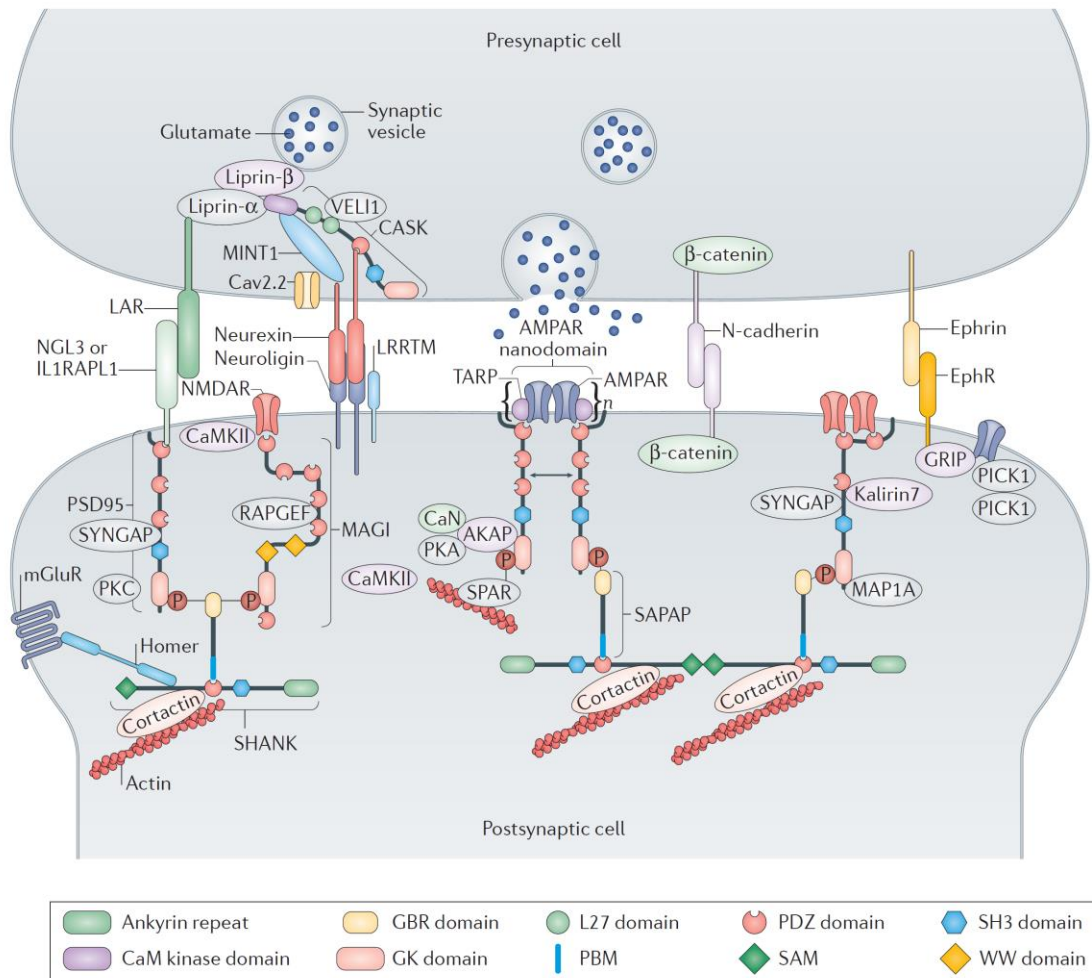


Figure 27 : Organisation moléculaire de la synapse excitatrice glutamatergique

Les parties pré- et post-synaptiques formant la synapse sont liées grâce au continuum de complexes protéiques situés de part et d'autre des deux parties. Ces complexes sont constitués de protéines à domaine PDZ telles que CASK (pré-synapse) et PSD-95 (post-synapse) et sont reliés par l'interaction des neuexines et des neuroligines. La post-synapse glutamatergique présente une architecture moléculaire caractérisée par la présence d'une densité post-synaptique (PSD). La PSD est constituée de protéines d'échafaudage telles que PSD-95 (DLG4) qui permet l'ancrage des récepteurs AMPA et NMDA, de protéines de signalisation telles que CamKII, qui permet la transmission du signal calcique, et de protéines du cytosquelette d'actine. D'après Zhu et al., 2016

- [PSD-95](#)

PSD-95 (DLG4) est la protéine la plus connue de la densité post-synaptique des synapses excitatrices. Elle fait partie de la famille des protéines MAGUK (membrane-associated guanylate kinase). Ces protéines contiennent trois domaines PDZ à leur extrémité N-terminale suivies d'un domaine SH3 et d'un domaine guanylate kinase-like. PSD-95 (DLG4) interagit directement avec les récepteurs NMDA (Fig.27). Elle serait importante pour l'organisation des récepteurs glutamatergiques à la membrane plasmique post-synaptique (Kim and Sheng, 2004).

- [HOMER](#)

Comme PSD-95, HOMER est une protéine d'ancrage de la densité post-synaptique (Fig. 27). Cette protéine influencerait sur la transmission de l'information synaptique en agissant indirectement sur le trafic et le clustering des récepteurs glutamatergiques, les flux de calcium et l'organisation du cytosquelette d'actine (Foa and Gasperini, 2009).

[Le cytosquelette d'actine](#)

L'architecture de l'épine dendritique est majoritairement formée d'un cytosquelette d'actine. C'est la dynamique de cette protéine qui permet les modifications morphologiques de l'épine avec l'activité synaptique. Le cytosquelette d'actine jouerait aussi un rôle dans l'organisation de la densité post-synaptique (Sheng and Hoogenraad, 2007), l'ancrage des récepteurs post-synaptiques (Renner et al., 2008) et la localisation de la machinerie de traduction (Bramham, 2008). Sa dynamique dépend de protéines modulatrices de la famille des Rho GTPases : Rho, Rac, et cdc42 (Spence and Soderling, 2015). Ces protéines sont elles-mêmes régulées par les GEFs, qui les activent, et les GAPs, qui les inhibent (Tolias et al., 2011). Toutes ces protéines ont été impliquées dans des anomalies de l'épine.

- [La voie Rac1](#)

La voie de signalisation de Rac1 avec sa GEF Kalirine-7 est connue pour être impliquée dans l'adaptation de la morphologie de l'épine selon l'activité neuronale. En 2007, l'équipe de Penzes a montré que suite à l'activation des récepteurs NMDA des neurones pyramidaux de l'hippocampe, la phosphorylation de Kalirine-7 conduit à l'activation de Rac1 et à l'élargissement de la morphologie des épines (Xie et al., 2007). Ce mécanisme impliquerait la protéine DISC1: l'inactivation de cette protéine dans des neurones induit en effet une perte des épines dendritiques matures et une augmentation des filopodes (Hayashi-Takagi et al., 2010). Rac1 a d'autre part été montrée comme impliquée dans la formation des épines et l'apprentissage (Bongmba et al., 2011; Haditsch et al., 2009) et a récemment été associée à la maladie d'Alzheimer (Huang et al., 2013; Pozueta et al., 2013)

Les récepteurs glutamatergiques

On peut distinguer deux grands types de récepteurs au glutamate : les récepteurs ionotropiques et les récepteurs métabotropiques. Les récepteurs métabotropiques sont des récepteurs à protéines G nommés mGluR. Les récepteurs ionotropiques sont des récepteurs canaux. Il en existe trois sortes pour le glutamate : les AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole-propionate), les NMDA (N-méthyl-Daspartate) et les Kainate, selon le nom de leur agoniste respectif. Ces récepteurs-canaux sont tous perméables aux cations.

- Les récepteurs AMPA

Les AMPA sont des récepteurs hétéro-tétramériques formés de deux dimères de sous-unités appelées GluA1 à GluA4, codées par les gènes GRIA1-GRIA4. Suite à la fixation du glutamate, les récepteurs AMPA deviennent perméables au sodium, au potassium, et parfois au calcium selon la composition du tétramère (Chater and Goda, 2014). Cette entrée de cations induit la dépolarisation de l'élément post-synaptique. Les AMPA se localisent à la membrane plasmique, face à la zone active de l'élément pré-synaptique. Ils présentent cependant une importante mobilité latérale le long de la membrane cellulaire ainsi que du compartiment membranaire au compartiment cytoplasmique (Borgdorff and Choquet, 2002). Cette dynamique influe sur l'efficacité de la transmission synaptique. L'acheminement des AMPA à la membrane se fait par exocytose grâce à un complexe SNARE post-synaptique (Jurado et al., 2013) et leur retrait passe par un processus d'endocytose dynamine-dépendant (Lee et al., 2002).

- Les récepteurs NMDA

Les récepteurs NMDA sont des récepteurs tétramériques constitués de deux sous-unités NR1 et de deux sous-unités régulatrices NR2A, B, C et D ou NR3A, B. L'ouverture du pore de ces récepteurs canaux dépend à la fois de la fixation du glutamate et d'une forte dépolarisation de la membrane post-synaptique. Cette dépolarisation est nécessaire pour induire la libération d'un ion magnésium qui obstrue le pore du canal à l'état basal (Nowak et al., 1984). Les NMDA sont perméables aux ions sodium, potassium, et calcium. Dans le cerveau adulte, les synapses sont enrichies en récepteurs contenant les sous-unités NR2A tandis que les zones extra-synaptiques sont enrichies en récepteurs contenant les sous-unités NR2B (Köhr, 2006). Comme les récepteurs AMPA, l'ajout à la membrane de récepteurs NMDA passe par la machinerie d'exocytose SNARE et leur retrait par un processus d'endocytose clathrine-dépendant.

D. La plasticité synaptique

La plasticité synaptique est le processus sous-tendant l'apprentissage et la mémorisation. Elle correspond à l'ensemble des mécanismes permettant au neurone d'adapter ses connectivités en fonction des informations qu'il reçoit. Ces mécanismes incluent entre autres l'endo/exocytose des vésicules synaptiques, le trafic des récepteurs membranaires et les modifications d'expression

génique. Ils peuvent être induits par les phénomènes de potentialisation à long terme (LTP) et dépression à long terme (LTD). Ces phénomènes de plasticité synaptique sont altérés dans la maladie d'Alzheimer.

1. *La potentialisation à long terme (LTP)*

Découverte de la LTP

La LTP est un des événements majeurs de la plasticité synaptique. Elle fut découverte pour la première fois en Norvège dans le laboratoire de Per Andersen par Terje Lomo en 1966, mais c'est avec Tim Bliss qu'il publiera les premiers résultats sur la LTP en 1973 (Bliss and Lomo, 1973). En faisant une stimulation à haute fréquence de la voie perforante de l'hippocampe, ils ont réussi à induire une augmentation persistante de l'efficacité de la transmission synaptique dans le gyrus denté : ce qu'on appelle aujourd'hui le phénomène de LTP. La LTP n'est pas propre aux synapses excitatrices de l'hippocampe, on l'observe dans beaucoup d'autres synapses de diverses régions du cerveau tel que l'amygdale, le cortex ou encore le cervelet. Elle est cependant beaucoup étudiée dans cette structure du fait de son organisation en une couche cellulaire simple et en trois synapses (Fig.28), qui facilite les stimulations / enregistrements électrophysiologiques in vitro et in vivo (Andersen et al., 1969).

Mécanismes moléculaires de la LTP (exemple du cas de la synapse collatérale de Schaffer-CA1)

Au cours d'une transmission synaptique brève à basse fréquence, le glutamate libéré par la pré-synapse des collatérales de Schaffer se lie à la fois aux récepteurs AMPA et NMDA mais le potentiel de membrane du neurone post-synaptique est à son niveau normal de repos. Les NMDA seront donc bloqués par l'ion magnésium et ne laisseront passer aucun courant. Une stimulation haute fréquence comme celle appliquée lors d'un protocole de LTP entraîne une dépolarisation prolongée de la membrane ayant pour conséquence l'expulsion du bouchon magnésium hors du canal du NMDA, permettant le passage des ions Ca^{2+} . Il s'ensuit une augmentation du calcium au niveau post-synaptique (Lynch et al., 1983). Les récepteurs NMDA sont donc les principaux responsables de l'entrée de Ca^{2+} impliquée dans la LTP (Collingridge et al., 1983). L'augmentation intracellulaire de Ca^{2+} induit l'activation des voies de transduction impliquant des protéines kinases comme les protéines kinase M (Ling et al., 2002), les extracellular signal-regulated kinases (Bading and Greenberg, 1991) les phosphatidylinositol 3-kinase (Man et al., 2003) et les calcium calmoduline dépendante protéines kinases (CamK) (Lisman et al., 2012; Malenka et al., 1989) qui participent à la consolidation et à l'amélioration de l'efficacité synaptique. Par exemple, l'activation de CaMKII induit la phosphorylation des récepteurs AMPA non synaptiques et augmente leur intégration à la PSD grâce à la phosphorylation de GluA1 en sérine 831 (Lisman et al., 2012).

2. *La dépression à long terme (LTD)*

La LTD est une forme de plasticité synaptique qui conduit à l'affaiblissement des synapses. Une stimulation basse fréquence prolongée induit une activation des récepteurs AMPA et NMDA, mais l'entrée de Ca^{2+} est moins importante que lors de l'induction d'une LTP (Yang et al., 1999). La faible entrée de Ca^{2+} va activer cette fois-ci des phosphatases calcium dépendantes et conduire à la diminution des courants post-synaptiques (Collingridge et al., 2010).

Chap. 5 : BIN1

Le gène BIN1 (Bridging Integrator 1), aussi appelé Amphiphysin 2, a été identifié comme le locus de susceptibilité le plus important pour la MAS après le locus APOE (<http://www.alzgene.org>). Une récente étude a estimé à 1,2% le risque de développer la MA chez les porteurs de l'allèle BIN1 associé à la pathologie (Naj et al., 2011).

A. Propriétés biochimiques de BIN1

Chez l'Homme, le gène BIN1 est localisé sur le chromosome 2 en position q14.3 et mesure 54 kb. A ce jour, ce gène est décrit comme comportant 20 exons subissant un épissage alternatif important, dont résulte au moins 10 isoformes différentes (Butler et al., 1997; Ramjaun et al., 1997; Wechsler-Reya et al., 1997a).

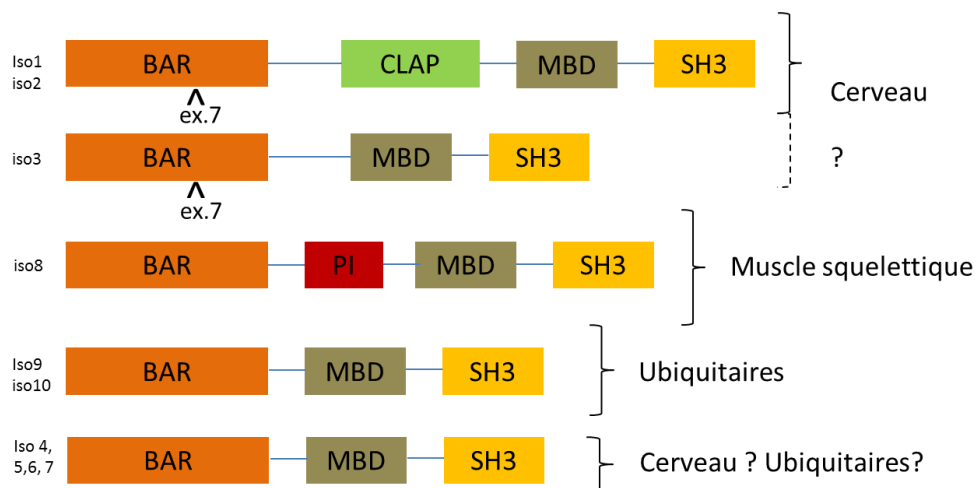
1. Domaines protéiques et isoformes

Initialement, la protéine BIN1 a été décrite comme possédant trois domaines: un domaine N-terminal BIN1/Amphiphysin/ RVS167 (BAR), un domaine interne d'interaction à MYC dit *MYC-Binding Domain* (MBD), et un domaine C-terminal SRC Homology 3 (SH3) (Ren et al., 2006).

La première nomenclature des exons de BIN1, proposée par Wechsler-Reya, se base sur la découverte d'un nouvel exon dans le domaine BAR, qui a alors été appelé exon 6a et des exons 13 à 16, qui sont alors appelés exons 12A-D (Wechsler-Reya et al., 1997a). Dans la nouvelle nomenclature, l'exon 6a est appelé exon 7, et les exons suivants ont été renumérotés en $n+1$. Beaucoup de publications utilisent encore l'ancienne nomenclature de Wechsler-Reya, ce qui n'est pas le cas de cette thèse qui utilise la nouvelle nomenclature. La numérotation des isoformes se base d'autre part sur celle utilisée par ncbi (www.ncbi.nlm.nih.gov/gene), et leur composition a été vérifiée par l'alignement de séquences de chaque exon.

Les variations majeures concernent les exons 7, 11, 13,14, 15 et 16. L'exon 7 encode un domaine N-terminal de 31 résidus inséré dans le domaine BAR. L'exon 11 encode un domaine de 15 acides aminés exprimé uniquement dans le muscle. Il s'agit d'un domaine d'interaction aux Phosphoinositides, dit PI (Phosphoinositide-interacting protein-domain). Les exons 13 à 16 encodent un domaine interne d'interaction avec la clathrine et AP-2/ α -adaptin, appelé domaine CLAP (Clathrin-Associated Protein-interacting domain). Les isoformes 1 et 2 de BIN1 présentent l'insertion de l'exon 7 et du domaine CLAP, ce qui leur confère une expression cerveau-spécifique (Fig. 29). L'isoforme 3 ne présente que le domaine CLAP sans l'exon 7. L'isoforme 8 présente l'insertion de l'exon 11, ce qui lui confère une expression muscle-spécifique. Les isoformes restantes, 4, 5, 6, 7, 9 et 10, ne présentent que les domaines de base, le BAR sans exon 7, le MBD et le SH3 avec de petites variations entre elles. Au vue

de leur composition, ces isoformes auraient une expression ubiquitaire, bien que plusieurs revues présentent les isoformes 4, 5, 6 et 7 comme étant neuronales (Prokic et al., 2014; Tan et al., 2013).



- BAR= BIN1-amphiphysin-Rvs167
- CLAP= clathrin-associated protein-binding domain
- MBD= Myc-Binding Domain
- SH3= Src Homology 3 domain
- PI= phosphoinositide-binding domain

Localisation subcellulaire:
Cytoplasmique
Nucléaire

Figure 29 : les isoformes humaines de BIN1 et leur patron d'expression

Le gène BIN1 subit un épissage alternatif important conduisant à la formation d'au moins dix isoformes chez l'humain. Certaines de ces isoformes présentent un patron d'expression tissulaire très spécifique, comme l'isoforme 1 et l'isoforme 8, exprimées uniquement respectivement dans le cerveau et dans le muscle squelettique. Au niveau de la cellule, BIN1 est exprimé à la fois au noyau et dans le cytoplasme cellulaire. La numérotation des exons et l'appellation des isoformes se basent sur la nouvelle nomenclature pour BIN1, également utilisée par Ncbi. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/274>)

2. Génétique de BIN1 dans la maladie d'Alzheimer

Le locus BIN1 a pour la première fois été identifié dans un GWAS comme ayant une association avec la MA en 2010 par l'équipe de S. Seshadri (Seshadri et al., 2010). Cette association a par la suite été confirmée par d'autres études (Kamboh et al., 2012; Naj et al., 2011). Plusieurs SNPs significatifs ont été identifiés, tous en dehors de la région codante du gène. Les plus significatifs sont rs744373 et rs7561528, tous deux situés dans la région 5' UTR (<http://www.alzgene.org>) (Fig. 30). L'explication la plus parcimonieuse du rôle de ces polymorphismes est qu'ils modifient l'expression du gène *BIN1*, comme montré dans Chapuis et al., 2013.

Association des SNPs BIN1 avec des traits phénotypiques de la MA

Depuis quelques années, des analyses sont menées afin de tester s’il existerait un lien entre les SNPs BIN1 sortis des GWAS MAS et des traits phénotypiques quantitatifs des patients les exprimant. Plusieurs études ont effectivement confirmé que de telles corrélations existaient avec des données d’imagerie cérébrale et des évaluations cognitives.

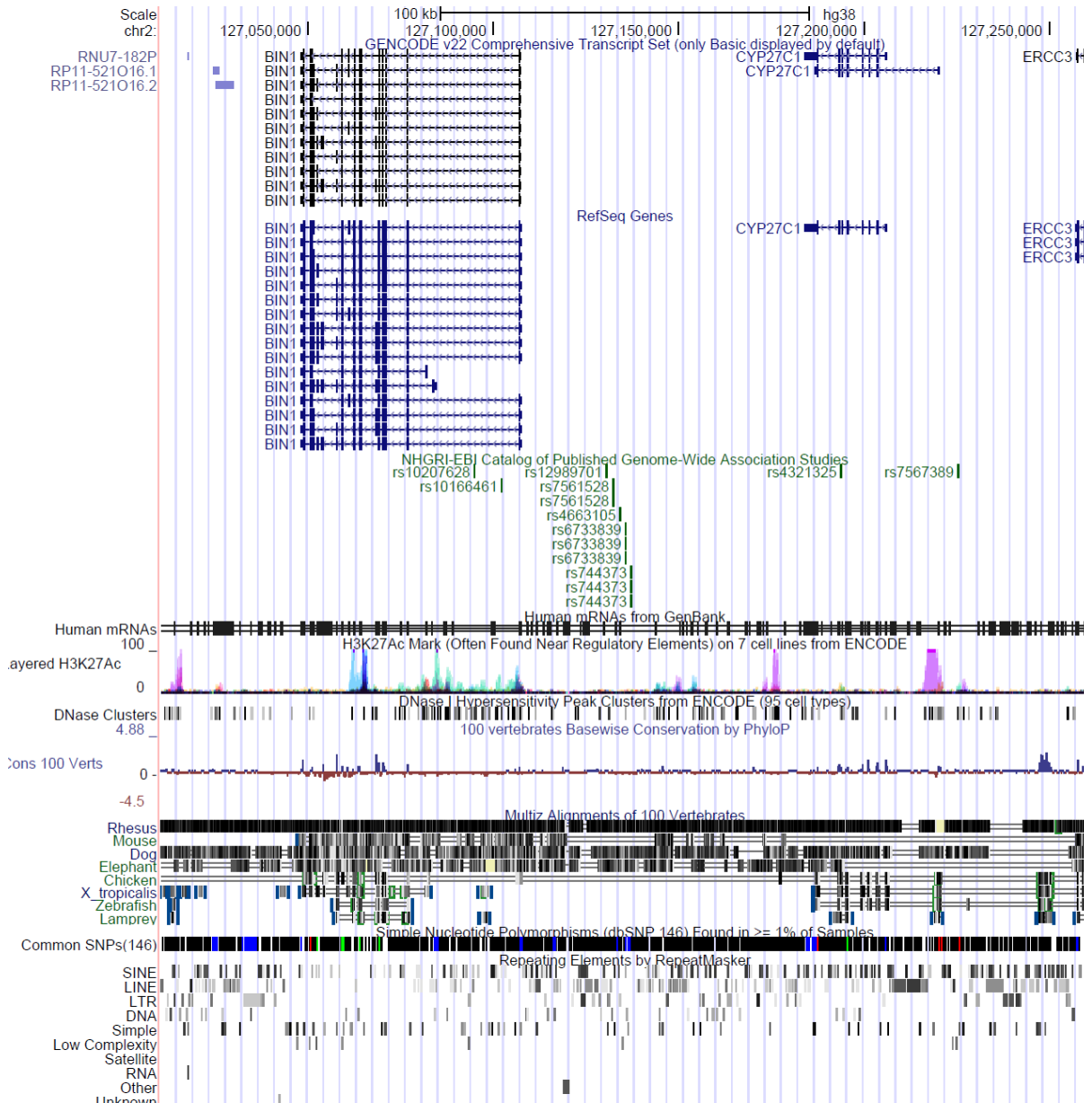


Figure 30. Position des SNPs d’intérêt de BIN1.
(serveur UCSC).

- [SNP BIN1 rs7561528](#)

En 2010, A. Biffi et son équipe testent l'association du rs7561528 avec plusieurs mesures d'imagerie démontrées comme étant hautement associées à la prédiction et la progression de la MA: les volumes de lésion de la matière blanche, de l'hippocampe, et de l'amygdale, et les épaisseurs du cortex entorhinal, du gyrus parahippocampique et du cortex temporal (Biffi et al., 2010). Cette étude menée sur 740 individus, dont des individus à cognition normale, d'autres diagnostiqués pour la MA, et d'autres pour un déficit cognitif léger, montre que le rs7561528 corrèle avec l'épaisseur des cortex temporal et entorhinal mais pas avec les autres mesures testées.

- [SNP BIN1 rs744373](#)

Plusieurs études ont été menées sur le rs744373, qui est le plus statistiquement significatif dans les analyses GWAS MA. Deux études différentes montrent une corrélation de ce SNP avec le volume hippocampique chez des sujets exempts de démence (Chauhan et al., 2015; Zhang et al., 2015). L'étude de X. Zhang et son équipe montre que les sujets porteurs de ce SNP présentent un volume hippocampique plus important, associé à moins de connectivités entre l'hippocampe et le cortex dorso-latéral préfrontal droit, et à de moins bons scores aux tests de mémoire de travail (Zhang et al., 2015). Une autre étude en population générale (cohorte des 3 cités), sur des sujets cognitivement sains et âgés de 65 ans et plus montre une corrélation entre la cognition globale et le SNP rs744373 (Vivot et al., 2015).

- [SNP BIN1 rs6733839](#)

Le SNP rs6733839 a récemment été associé à la MA par l'équipe de J.C. Lambert (Lambert et al., 2013). Une étude très récente a testé la corrélation de ce SNP avec six marqueurs d'imagerie, le métabolisme du glucose et les dépôts d'A β sur une large cohorte composée d'individus à cognition normale, ou diagnostiqués pour la MA, ou pour un déficit cognitif léger (Li et al., 2016). Cette étude révèle que ce nouveau SNP corrèle avec le volume du cortex pariétal inférieur mais pas avec les autres paramètres testés.

B. Fonctions de la protéine BIN1

BIN1 est un gène à l'expression complexe dont la traduction donne lieu à de nombreux variants avec des domaines protéiques différents et des patrons d'expression particuliers. Ces multiples isoformes vont naturellement avoir des rôles différents au sein des différents types cellulaires et des compartiments cellulaires dans lesquelles elles s'expriment.

1. *Fonction de BIN1 dans l'endocytose*

La protéine BIN1, également connue sous le nom d'Amphiphysine 2, fait partie de la superfamille des protéines à domaine BAR. Ces domaines protéiques se dimérisent pour adopter une forme

caractéristique de banane et se lie aux membranes pour réguler leur courbure (Gallop and McMahon, 2005; Peter et al., 2004). Cette capacité confère aux protéines à domaine BAR un rôle majeur dans les processus d'endocytose. Selon les caractéristiques de leur domaine BAR, chacune de ces protéines peut imposer une courbure particulière à la membrane (Qualmann et al., 2011). BIN1 présente un domaine de type N-BAR, semblable à celui d'Amphiphysine I (Fig. 31). BIN1 et Amphiphysine I formeraient un hétérodimère permettant à chacune des protéines de se stabiliser (Di Paolo et al., 2002) et d'assurer leur fonction dans l'endocytose clathrine-dépendante. Les amphiphysines participeraient à la scission de la vésicule synaptique avec la membrane dans les cellules neuronales et non-neuronales.

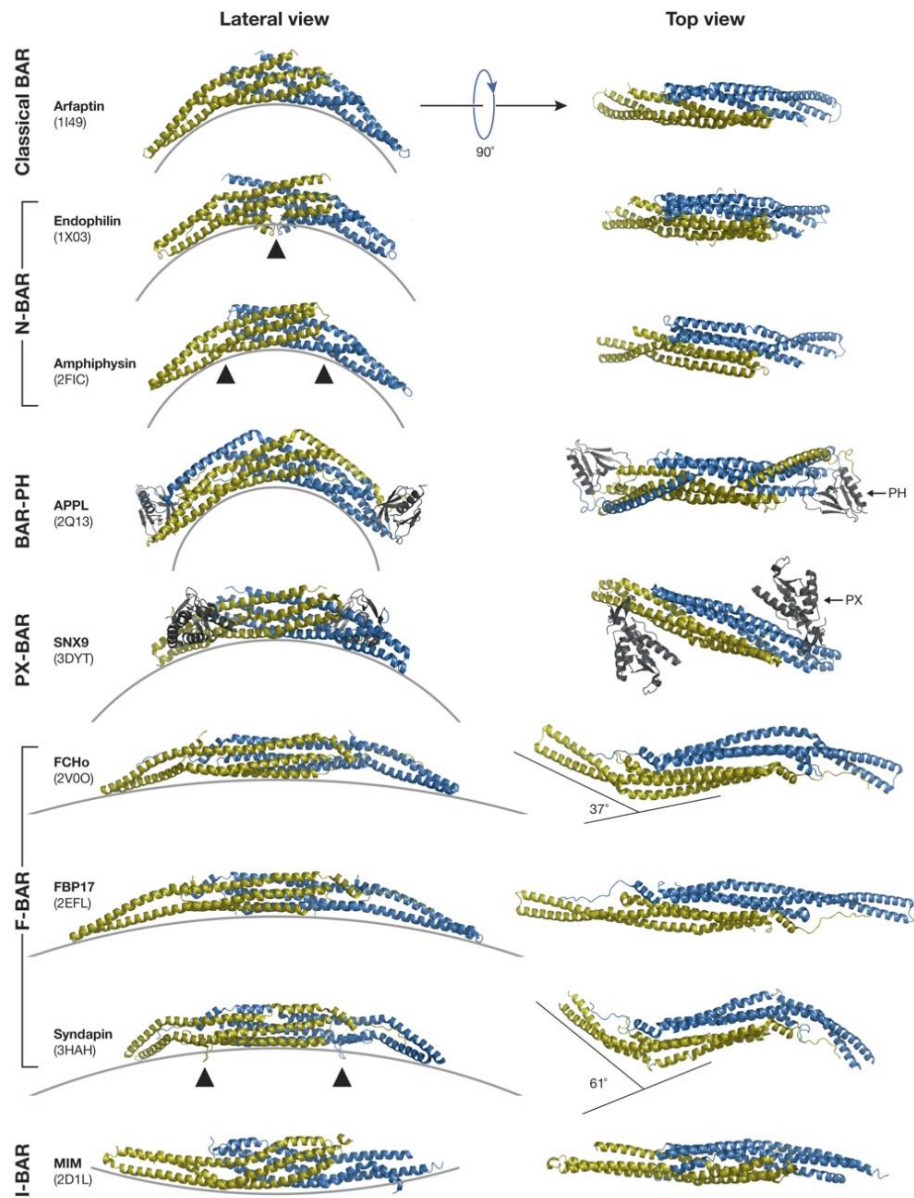


Figure 31 : les différents domaines BAR et leur courbure

Représentation de la courbure adoptée par les dimères (un monomère en jaune, l'autre en bleu) des différents types de domaines BAR. A gauche : vue de côté, à droite : vue de haut. Les flèches noires indiquent les positions des résidus hydrophobiques d'insertion membranaire. Certains domaines présentent des modules supplémentaires PH et PX indiqués en gris. BIN1 et Amphiphysine I présentent un domaine de type N-BAR. D'après Qualmann et al. , 2011

BIN1 dans l'endocytose pré-synaptique

- L'endocytose à la membrane plasmique

Les isoformes neuronales de BIN1 (Fig. 29) participeraient à ce processus au niveau des terminaisons nerveuses, ou éléments pré-synaptiques. Les hétérodimères BIN1-Amphiphysine I y entraîneraient le recrutement de nombreuses molécules de dynamine aux sites d'endocytose rapide et favoriseraient la préparation de l'étape de bourgeonnement (Owen et al., 1998; Wigge and McMahon, 1998) (Fig. 32).

De plus, le domaine SH3 de l'amphiphysine 1 et 2 favoriserait le désassemblage de l'anneau de dynamine (Owen et al., 1998; Picas et al., 2014). Les amphiphysines peuvent également interagir avec d'autres protéines impliquées dans l'endocytose médiée par la clathrine, tels que le complexe adaptateur de la membrane plasmique AP-2, qui va servir au recrutement de la clathrine et des autres molécules impliquées dans l'endocytose (Leprince et al., 1997; Ramjaun et al., 1997) et la synaptojanine, une protéine impliquée elle aussi dans l'endocytose et située au niveau des synapses (Cestra et al., 1999) (Fig. 32).

Enfin, le domaine CLAP des isoformes neuronales de BIN1 peut également se fixer sur l'endophiline A1, une protéine située au niveau des synapses et impliquée elle aussi dans l'endocytose médiée par la clathrine (Ringstad et al., 1999) (Fig. 32). BIN1 pourrait également interagir directement avec la clathrine (Ramjaun et al., 1997).

- L'endocytose à la membrane des organites

Il est important de noter que le processus d'endocytose clathrine-dépendant ne se fait pas uniquement à la membrane plasmique, mais également sur la membrane d'organites telles que l'appareil de Golgi. Il a ainsi été montré que BIN1 participerait à cette endocytose, via le recrutement de la protéine AP-1 et grâce à son domaine CLAP (Huser et al., 2013).

2. Fonction de BIN1 dans le trafic intracellulaire

Une étude de 2003 propose l'implication de BIN1 dans le trafic intracytoplasmique des endosomes (Leprince et al., 2003). En effet, les auteurs mettent en évidence l'interaction de BIN1 avec la protéine Sorting Nexin 4 (SNX4), connue pour être impliquée dans le trafic vésiculaire (Traer et al., 2007; van Weering et al., 2012). Cette interaction se ferait via le domaine BAR de BIN1. Dans des cellules de mammifères, l'équipe de C. Leprince montre que BIN1 est localisable au niveau des endosomes précoces où SNX4 est exprimée.

3. Fonction de BIN1 dans l'organisation du cytosquelette

BIN1 a été montrée comme interagissant avec plusieurs acteurs et partenaires du cytosquelette cellulaire. Dans des cellules musculaires, une interaction directe entre BIN1 et l'actine a été décrite

(D'Alessandro et al., 2015; Fernando et al., 2009), ainsi qu'une interaction avec la protéine N-WASP, régulatrice du cytosquelette d'actine (Falcone et al., 2014). BIN1 a également été décrite comme interagissant avec une protéine liée à l'extrémité (+) des microtubules, CLIP-170, dans des lignées tumorales HeLa et dans des cellules musculaires (D'Alessandro et al., 2015; Meunier et al., 2009). Dans les neurones, les cytosquelette d'actine et de microtubules constituent des acteurs essentiels de la morphologie dendritique et synaptique (Cingolani and Goda, 2008; Jaworski et al., 2009). La protéine CLIP-170 a également été impliquée dans la morphologie dendritique via son influence sur les microtubules et son interaction avec IQGAP1, une protéine impliquée dans régulation du cytosquelette d'actine (Swiech et al., 2011). Certaines études montrent de plus l'entrée des microtubules dans l'épine dendritique (Merriam et al., 2013). N-WASP a été montrée comme ayant un rôle critique dans le développement des épines dendritiques et des synapses (Wegner et al., 2008). BIN1 pourrait ainsi avoir un rôle dans la régulation de la plasticité synaptique via ces partenaires protéiques.

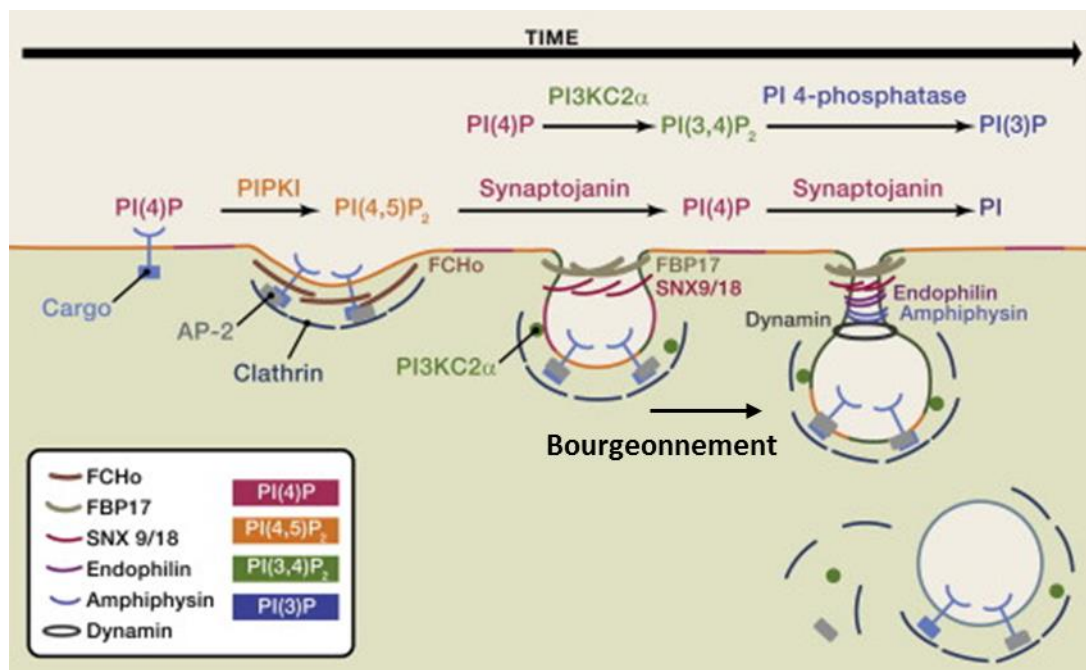


Figure 32 : L'endocytose clathrine-dépendante à la membrane plasmique.

L'endocytose clathrine-dépendante est initiée par l'assemblage de protéines à domaines F-BAR (FCHo) et d'adaptateurs cytoplasmiques (AP-2, clathrine) à la membrane plasmique. La formation du puits de clathrine nécessite l'intervention d'autres protéines à domaines F-BAR telles que FB17. Les protéines à PX-BAR domaine SNX9/18 sont également recrutées pour la maturation du puits de clathrine. Les protéines BAR à forte courbure telles que les amphiphysines et l'endophiline participent au bourgeoisement en s'assemblant autour du cou du puits et en y recrutant la GTPase dynamine. L'hydrolyse du GTP par cette protéine permet finalement la fission membranaire et l'endocytose de la vésicule ainsi formée. D'après Daumke et al., 2014.

4. Fonctions de BIN1 au niveau du noyau

BIN1 est une protéine nucléocytoplasmique (Wechsler-Reya et al., 1997a). Son isoforme 9, exprimée dans tous les types cellulaires, serait majoritairement nucléaire (Wechsler-Reya et al., 1997b). Dans ce compartiment, BIN1 est décrit comme agissant sur trois grands mécanismes : l'apoptose, le cycle cellulaire et la réparation de l'ADN (Fig. 33A-B).

Apoptose et cycle cellulaire

Le domaine MBD de BIN1 interagit avec le domaine MB1 de c-MYC, un facteur de transcription jouant un rôle majeur dans la croissance et la mort cellulaire. BIN1 aurait un rôle de suppresseur de tumeur via la régulation de ce facteur (fig.33A-B). Dans des cellules tumorales, la surexpression de BIN1 induit le déclin de la croissance cellulaire voire la mort cellulaire programmée (Ghaneie et al., 2007; Sakamuro et al., 1996).

Réparation de l'ADN

BIN1 est capable d'interagir avec l'enzyme PARP1 (poly [ADP-ribose] polymérase 1) impliquée dans la réparation des dommages de l'ADN. En interagissant avec PARP1, BIN1 inhiberait sa capacité de réparation de l'ADN (Fig. 33A) (Pyndiah et al., 2011).

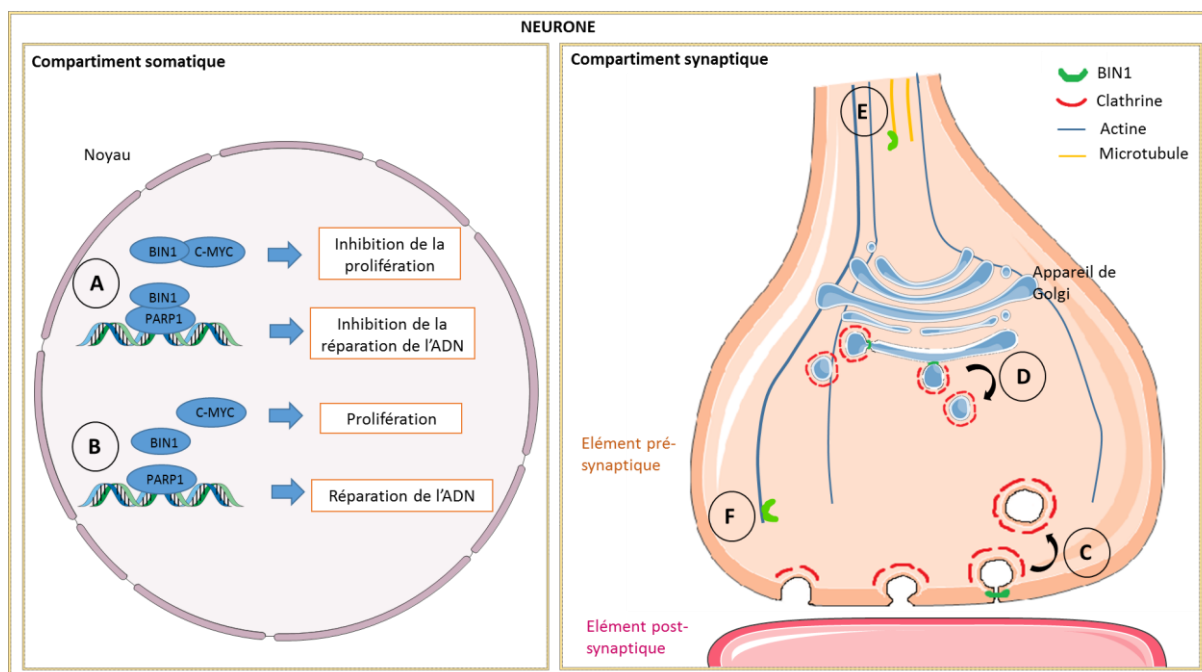


Figure 33: Rôles possibles de BIN1 dans les neurones

Au niveau du noyau (cadre de gauche) BIN1 participe à la régulation du cycle cellulaire et de la réparation de l'ADN. Lorsque BIN1 interagit avec les facteurs c-myc et PARP1 (A), il inhibe leurs rôles respectifs d'induction de la prolifération cellulaire et de réparation de l'ADN (B). Ce processus a été décrit dans des situations de surexpression de BIN1 (A).

Au niveau synaptique (cadre de droite), BIN1 est impliqué dans l'endocytose clathrine-dépendante à la membrane plasmique (C) et pourrait avoir un rôle dans le trafic vésiculaire du système endosomal (D). Son interaction avec les protéines CLIP-170 et N-WASP l'implique également dans la régulation des cytosquelettes de microtubules (E) et d'actine (F) respectivement.

C. Rôles possibles de BIN1 dans la maladie d'Alzheimer

Plusieurs hypothèses peuvent être formulées quant à la participation de BIN1 dans le développement, l'évolution et/ou le maintien de la MA.

1. BIN1 et système endosomal

Des études ont rapporté une atteinte du système endosomal dans le cerveau des patients atteints de MAS. L'équipe de Randy Nixon a montré que les endosomes précoces, sites d'internalisation du peptide A β et d'ApoE, étaient élargis dans le cortex entorhinal et la corne d'Ammon de l'hippocampe des patients au stade précoce de la maladie (Cataldo et al., 1997). Cet élargissement, caractéristique d'une augmentation de l'endocytose, serait plus prononcé chez les patients porteurs de l'allèle ApoE ϵ 4 et précéderait l'accumulation du peptide A β (Cataldo et al., 2000). Cette morphologie des endosomes a été retrouvée dans des neurones dérivés d'IPSCs (induced pluripotent stem cell) de patients (Israel et al., 2012). L'équipe de Scott Small a d'autre part mis en évidence un dysfonctionnement du

rétromère, un complexe protéique dont le rôle est d'orchestrer le transport des cargos en dehors des endosomes dans le cortex entorhinal des patients atteints de MA (Small et al., 2005). Un dysfonctionnement de ce complexe, impliqué dans le transport l'APP en dehors des endosomes, conduit à l'accumulation de peptide A β (Bhalla et al., 2012). D'autres études ont également relié un dysfonctionnement endosomal à la neuroinflammation (Lucin et al., 2013) et à la TAUopathie (Michel et al., 2014) observés dans la MA.

BIN1 est le second plus important facteur de risque de la MA sporadique et est impliqué dans le système endolysosomal, particulièrement l'endocytose pré-synaptique. Il pourrait ainsi exister un lien entre le produit de ce gène et les altérations du système endosomal mises en évidence dans le cerveau des patients.

2. BIN1 et TAUopathie

Une interaction entre les protéines BIN1 et TAU a récemment été mise en évidence (Chapuis et al., 2013). Cette interaction se ferait via le domaine SH3 de BIN1, et co-localiserait partiellement avec le cytosquelette d'actine des neurones (Sottejeau et al., 2015). BIN1 pourrait ainsi avoir un rôle dans la tauopathie associée à la MA. L'interaction n'a cependant pas pu être mise en évidence au niveau des dégénérescences neurofibrillaires.

3. BIN1 et synaptopathie

BIN1 interagit avec des protéines régulatrices du cytosquelette d'actine (N-WASP) et de microtubules (CLIP-170, TAU) et pourrait ainsi être impliquée dans le développement des épines dendritiques et de leur plasticité. Une altération de BIN1 quelle qu'elle soit pourrait avoir un rôle dans la perte synaptique observée dans la physiopathologie de la MA.

4. BIN1 et neurodégénérescence

Au niveau du noyau, la surexpression de BIN1 est à l'origine de l'inhibition de la réparation de l'ADN. Plusieurs études ont suggéré une surexpression de BIN1 chez les patients atteints de MA. BIN1 pourrait ainsi potentiellement participer à la mort neuronale observée dans cette pathologie.

METHODOLOGIE GENERALE

Cette thèse a pour vocation de s'inscrire dans une méthodologie globale de Biologie des Systèmes. Le but de ce chapitre est d'expliquer les bases de cette méthodologie.

La Biologie des Systèmes : Définition

La biologie des systèmes est une approche pluridisciplinaire dont le but est d'atteindre une meilleure compréhension d'un système complexe (Figure 34). Le but de la biologie des systèmes se définit comme « comprendre les interactions dynamiques entre composants d'un système vivant, et entre systèmes vivants en interaction avec l'environnement. La biologie systémique est une approche par laquelle des questions biologiques sont abordées en intégrant les expérimentations avec la modélisation, la simulation et la théorie dans des cycles itératifs » [Consortium ERASysBio (2006-2010, 13 pays européens et associés)].

L'enjeu principal de la biologie des systèmes est le passage d'une approche réductionniste de l'étude des entités séparées à une étude globale de ces entités et de leurs interactions. Le développement de ce type d'approche a été permis par l'évolution des capacités d'intégration et de modélisation informatique des données, mais également par le développement de techniques systématiques à haut débit, telles que les puces ADN et ARN. Cette nouvelle méthodologie de travail est directement liée à la production des « Big Data » : un rassemblement massif d'informations sur un système donné qui nécessite des outils informatiques très puissants de gestion et d'analyse.

La biologie des systèmes a deux atouts majeurs. Elle permet tout d'abord une approche du système sans hypothèses permettant de réduire les biais d'expérimentation, et également une amélioration du rendement de la recherche (plus d'informations initiales, moins de biais, des prédictions mathématiques) et de son impact clinique (prédire l'effet clinique d'une espèce chimique grâce à la création d'outils et de bases de données).

Cependant, son aspect prédictif basé sur l'utilisation des « Big Data » reste un sujet controversé (Husain, 2014). Il est nécessaire de garder à l'esprit la différence importante entre prédictions et relations de causalité.

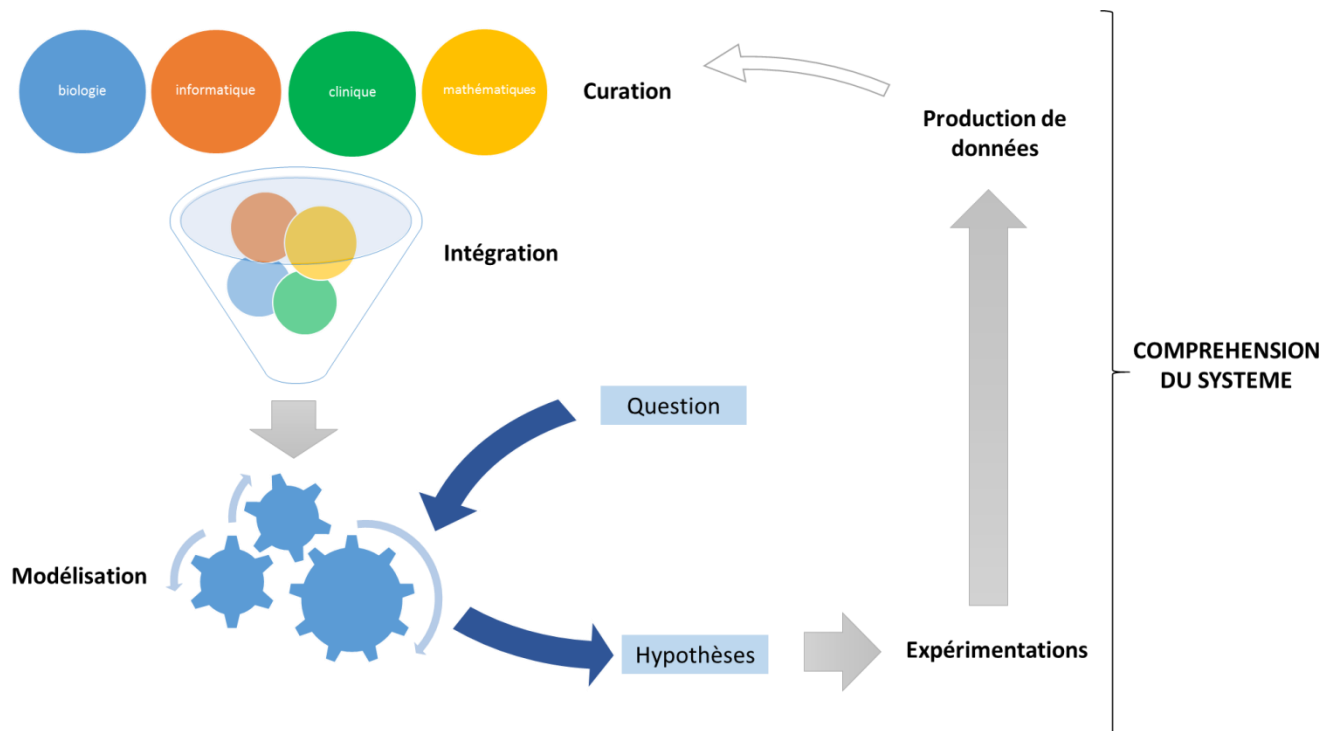


Figure 34 : La biologie des systèmes

La biologie des systèmes est un processus dynamique comprenant d'une part l'enrichissement d'une banque de données (expérimentations et curation permettant l'accumulation d'un maximum d'informations sur le système d'intérêt), et d'autre part la modélisation de l'ensemble des données dans le but de formuler des hypothèses et des prédictions sur le système, qui pourront par la suite être testées et validées ou non par expérimentation.

Application de la Biologie des systèmes à l'étude de la maladie d'Alzheimer

Le diagnostic de la MA reste à ce jour complexe et probabiliste. La compréhension des mécanismes de cette pathologie reste encore à élucider afin de progresser dans son diagnostic et sa prise en charge médicale. Les approches classiques de recherche n'ayant pour l'instant pas mené à une compréhension des causes de la MA, et la nécessité de développer des traitements pour cette pathologie ne cessant de grandir au niveau socio-économique, on assiste depuis le début des années 2000 à un accroissement de l'application de la biologie des systèmes à cette pathologie.

On peut distinguer deux aspects dans l'application de la biologie des systèmes à l'étude d'une pathologie :

1- L'utilisation des données pour générer des hypothèses de travail : Utilisation de modélisation du système normal, des modèles de la pathologie (modèles cellulaires, modèles animaux) et des données cliniques (traits phénotypiques, génotypes, analyses de biopsies, imagerie...). Dans le cas des maladies psychiatriques complexes telles que la MA, la recherche se base notamment sur des études systémiques de biomarqueurs, de génétique (GWAS), et de voies de signalisation.

2- L'intégration des différentes composantes de la pathologie : la pathologie est un système en soi, qui présente, comme tout système, différentes composantes qui ont longtemps été traitées séparément : atteinte métabolique, atteinte histologique, atteinte cognitive... Utiliser la biologie des systèmes implique de prendre en compte l'ensemble des aspects de la pathologie et leur interdépendance.

OBJECTIFS

Introduction

Cette thèse utilise la biologie des systèmes pour générer des hypothèses de travail et mettre en évidence de nouvelles voies de signalisation moléculaires impliquées dans la MA.

Elle s'inscrit dans un projet européen FP7 de biologie des systèmes, AgedBrainSysbio (<http://www.agedbrainsysbio.eu/>).

Ce projet a débuté en 2013 et regroupe les efforts de 14 entreprises et laboratoires académiques. Il s'attache à identifier, modéliser et manipuler de nouvelles voies de signalisation impliquées dans le vieillissement pathologique et la maladie d'Alzheimer à début tardif. Il s'organise en 6 groupes de travail (Fig. 35). La thèse s'inscrit dans la génération de données, qui comprend les groupes de travail 2 (Identification de nouvelles interactions protéiques) et 3 (Test de voies de signalisation).

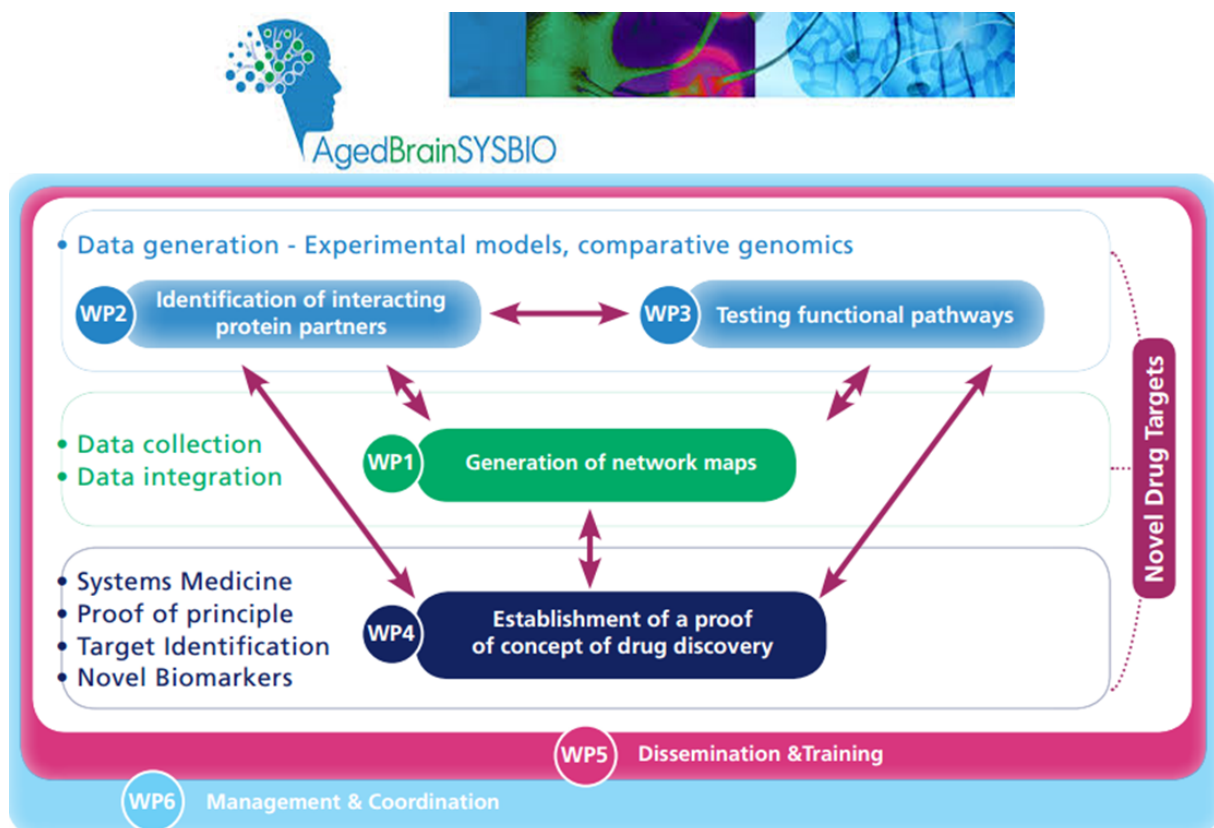


Figure 35 : Organisation du projet européen AgedBrainSysbio.

Objectifs de la thèse

Objectif 1 : Mise en évidence de nouvelles voies de signalisation de la protéine BIN1

Afin d'enrichir les informations sur les causes génétiques de la MA, des Genome Wide Association Studies (GWAS) ont été menées sur de très grandes cohortes de patients atteints de MA par rapport à des individus sains du même type. Le travail de thèse s'est appuyé sur les résultats de ces études génétiques, dont les 10 résultats les plus significatifs sont décrits dans le Tableau 5.

Le premier gène le plus associé à la MA selon ces études est le gène APOE (Coon et al., 2007), codant pour la protéine Apolipoprotéine E. Cette protéine présente trois isoformes : APOEε2, APOEε3, et APOEε4 (Mahley et al., 2006). L'isoforme APOEε4 a été montrée comme étant un facteur de risque de la MA depuis 1993 (Corder et al., 1993; Strittmatter et al., 1993). Les porteurs de cette version du gène présentent en effet un risque plus élevé de développer une MA que les individus APOEε3/APOEε3: une hétérozygotie APOEε3/APOEε4 induit un risque trois fois plus important, et une homozygotie APOEε4 un risque dix fois plus important (Bertram et al., 2007). Plusieurs hypothèses de l'implication d'ApoE dans la pathophysiologie de la MA ont depuis été proposées : participation à la pathogénicité d'Aβ (Beffert et al., 1998; Cole and Ard, 2000; Yamauchi et al., 2000; Yang et al., 1997), aux processus neuroinflammatoires (LaDu et al., 2001), ou à l'atteinte métabolique (Elosua et al., 2004). Le gène ApoE et son rôle dans la pathogénicité de la MA ont donc largement été exploré, mais la restriction du travail à ce gène n'a pas encore permis d'élucider les mécanismes moléculaires complexes de la MA. Le travail de thèse a eu pour but de prendre en considération la complexité de la pathologie et d'exploiter les résultats des GWAS pour proposer de nouvelles voies de signalisation pouvant y être impliquées.

Bien que de multiples types cellulaires aient été montrés comme impliqués dans la pathogénicité de la MA (De Strooper and Karran, 2016), le choix a été fait de restreindre l'étude aux voies de signalisation neuronales pour cette pathologie qui se caractérise principalement par des lésions neuronales et une neurodégénération. Les premiers mois du projet ont été consacrés à la recherche de l'expression des différentes protéines codées par les « top10 » du GWAS (Tableau 5) dans le modèle d'étude, les neurones primaires. Des expérimentations d'immunofluorescence et de western blot ont permis de montrer une bonne expression des protéines BIN1 et PICALM.

Le travail s'est naturellement focalisé sur BIN1, le gène le plus significativement associé à la MA par ces études de GWAS.

La mise en évidence de nouvelles voies de signalisation de BIN1 s'est appuyée sur des expérimentations de double-hybride menées par la société Hybrigenics Services, partenaire du projet AgedBrainSysbio et co-encadrant la thèse (financement CIFRE). La première partie de mon projet a été la validation et l'étude des nouvelles interactions de BIN1 dans mon système d'étude.

#	Gene	Polymorphisme	P-value
1	APOE e2/3/4	APOE_e2/3/4	<1E-50
2	BIN1	rs744373	1.59E-26
3	CLU	rs11136000	3.37E-23
4	ABCA7	rs3764650	8.17E-22
5	CR1	rs3818361	4.72E-21
6	PICALM	rs3851179	2.85E-20
7	MS4A6A	rs610932	1.81E-11
8	CD33	rs3865444	2.04E-10
9	MS4A4E	rs670139	9.51E-10
10	CD2AP	rs9349407	2.75E-09

Tableau 5 : Tableau des 10 gènes les plus associés à la Maladie d'Alzheimer par la méthode des GWAS et de leurs SNPs les plus significatifs

Les gènes sont ordonnés selon leur p-value, du plus au moins significatif. D'après <http://www.alzgene.org/TopResults.asp>

Objectif 2 : Recherche de l'implication de BIN1 dans la pathogénicité de la maladie d'Alzheimer Sporadique

Mon travail de thèse a également consisté en la caractérisation moléculaire d'un nouveau modèle de souris transgénique exprimant le gène BIN1 humain, nommée ici la souris *hBIN1*.

Ce modèle murin est basé sur les résultats d'analyses microarray montrant une augmentation des ARNm BIN1 dans le cerveau de patients atteints de MA (Résultats, Partie I). Afin de comprendre les résultats de comportement et d'électrophysiologie obtenus par des collaborateurs, j'ai mené des expériences au niveau moléculaire (microarrays, immunoprécipitations), cellulaire (immunofluorescence, PLA, et imagerie super-résolue sur neurones primaires) et histologique (marquage Dil et expérience de neurogenèse). Je me suis également appuyée sur les résultats de la première partie de mon travail de thèse afin de comprendre l'impact de l'expression du gène humain BIN1 dans le modèle murin.

MATERIELS ET METHODES

Souris transgéniques hBIN1

La souris hBIN1 est une lignée transgénique exprimant le gène BIN1 humain en plus du gène BIN1 murin. Cette lignée a été construite à l'Institut Clinique de la Souris (ICS, Illkirch, France; <http://www-mci.u-strasbg.fr>). Elle a été produite via l'utilisation d'un BAC (Bacterial Artificial Chromosome), c'est-à-dire une construction utilisant le plasmide F de la bactérie *Escherichia coli*, permettant d'insérer des fragments de 150-350 kbp. L'utilisation de ce type de plasmide permet l'incorporation de ces grandes séquences d'ADN dans le génome bactérien dans lequel l'ADN reste stable tout au long des cycles de réplication. La souris hBIN1 a été produite à partir du BAC RP11-437K23, généré par le centre de recherche de l'hôpital pour enfants d'Oakland (Children's Hospital Oakland Research Institute, BACPAC Center, Californie). Ce BAC contient le gène BIN1 humain entier. Après vérification par PCR et séquençage Sanger, une préparation du BAC (Kit de Maxiprep, NucleoBond® BAC 100; Macherey Nagel) a été microinjecté dans le pronuclei d'oocytes fertilisés de souris c57bl/6N. Ce processus a permis d'obtenir onze fondateurs. Pour chaque lignée, le nombre de copies de BAC a été quantifié par qPCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master). Les souris hémizygotés Tg(BIN1)/0 sont celles utilisées pour les expérimentations. Elles surexpriment trois fois le BIN1 humain (Voir Résultats, Partie I).

Proximity Ligation Assay

Le projet de thèse s'est appuyé sur la technologie de Proximity Ligation Assay pour la validation des interactions protéine-protéine en système neuronal.

Principe (Fig. 36)

La Proximity ligation Assay (PLA) est une méthode permettant de visualiser et de quantifier les protéines, leurs modifications post-traductionnelles et leurs interactions *in situ*. Les cibles sont détectées par un ou deux anticorps primaires. Pour la détection d'une interaction, il est nécessaire d'utiliser deux anticorps d'espèces différentes. Les anticorps secondaires sont couplés à des oligonucléotides qui, suite à une réaction de ligation, vont former un cercle d'ADN s'ils sont proches d'une distance inférieure ou égale à 30-40 nm. Une étape de polymérisation avec des sondes fluorescentes permet ensuite une amplification de ce cercle d'ADN et ainsi la détection des cibles *in situ*. La PLA a été utilisée ici dans le but de valider, de localiser et de quantifier des interactions protéiques.

Protocole

Les cellules (neurones primaires ou lignées cellulaires) sont fixées 20 minutes en Paraformaldéhyde 4% PBS1X à température ambiante et la PLA est effectuée selon les recommandations commerciales (Duolink, Sigma). Les anticorps primaires sont incubés dans une solution de 0,5% Tween, 3% BSA PBS1X durant 1h30 à 37°C. A la fin du protocole, l'actine est marquée via la Phalloïdine Alexa 488 (Thermo

Fisher). Le résultat est imagé soit en épifluorescence soit en microscopie confocale, selon le but de l'expérimentation, et les points de PLA sont analysés avec les logiciels ImageJ ou Velocity respectivement. Lorsque la PLA a été associée à une immunofluorescence (marquage de PSD-95 ou de géphyrine), une étape de pré-perméabilisation de 30 minutes en PBS1X Tween 0,1% a été effectuée avant le protocole de PLA. L'immunofluorescence a été effectuée immédiatement après la PLA, après un simple rinçage en PBS1X.

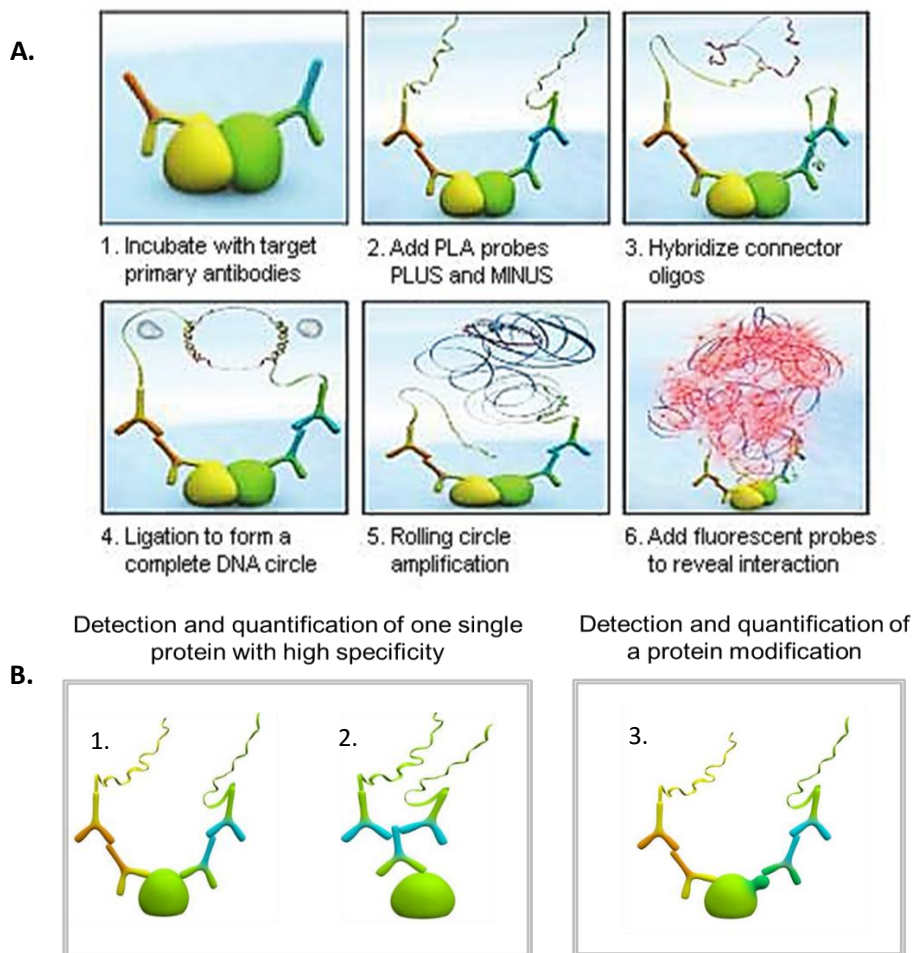


Figure 36 : Principe de la Proximity Ligation Assay (PLA)

(A) Détection d'une interaction. Après incubation des anticorps primaires visant chacun une des deux protéines d'intérêt (1), les cellules sont incubées avec les sondes constituées d'anticorps secondaires liés à des oligonucléotides capables de se lier (2-3). La ligation conduit à la formation d'un cercle d'ADN (4), qu'on amplifie par une étape de polymérisation (5). Des sondes fluorescentes viennent ensuite s'hybrider à l'ADN amplifié, permettant la détection de l'interaction.

(B) Détection d'une protéine seule. La détection d'une protéine seule par PLA peut se faire par l'utilisation de deux anticorps visant des parties différentes de la protéine (1). Dans ce cas, deux anticorps d'espèces différentes seront nécessaires. Elle peut également se faire par l'utilisation d'un seul anticorps et de l'incubation subséquente de sondes + et - visant la même espèce (2). L'utilisation d'un anticorps spécifique d'une modification post-traductionnelle d'une protéine permet, de même, sa détection par PLA (3).

Spectrométrie de masse à partir d'immunoprécipitation endogène sur synaptosomes

La spectrométrie de masse est une méthode de protéomique permettant la détection de l'ensemble des peptides présents dans un extrait. Afin de détecter de nouveaux interactants synaptiques de BIN1, nous avons appliqué cette technique sur l'éluat d'une immunoprécipitation de la protéine BIN1 endogène faite à partir de synaptosomes. L'ensemble de la procédure est décrit en Figure 37. Les synaptosomes sont le résultats d'un fractionnement cellulaire permettant d'isoler l'ensemble formé par le compartiment pré-synaptique, la membrane post-synaptique et les protéines de la densité post-synaptiques qui y sont associées. Les cortex et hippocampes frais de souris adultes sont homogénéisés puis centrifugés à plusieurs reprises. Le culot contenant les vésicules synaptiques est ensuite placé sur un gradient de Percoll et ultracentrifugé, permettant l'isolation de la fraction synaptosomale finale. C'est à partir de cette fraction, lysée dans un tampon natif, que l'immunoprécipitation de BIN1 a été effectuée. La fraction a été incubée avec un anticorps anti-BIN1 ou avec une fraction IgG souris accrochés de manière covalente à des billes G. Après rinçages, les billes ont été élués et les éluats ont été envoyés à l'analyse en spectrométrie de masse. Chaque immunoprécipitation a été faite à partir de 10 mg de protéines. Les analyses de spectrométrie de masse (LC/MS/MS) ont été effectuées par Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Suisse (www.dualsystems.com).

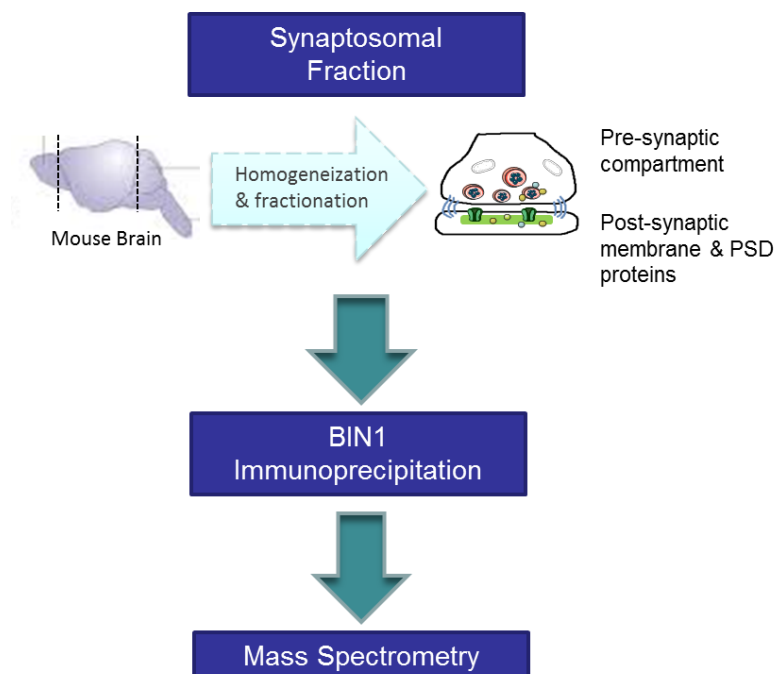


Figure 37 : Détection des interactions de BIN1 en synaptosomes

La protéine BIN1 endogène est immunoprécipitée à partir d'une fraction synaptosomale. L'éluat de l'immunoprécipitation est ensuite analysé par spectrométrie de masse pour détecter l'ensemble des peptides qui y sont présents.

Microdissection laser des sous-structures de l'hippocampe et analyses microarray

Nous avons souhaité comparer l'expression des gènes entre les souris sauvages et celles de la lignée hBIN1 au niveau de l'hippocampe, structure d'intérêt de la MA. Nous avons pour cela mené des analyses de microarrays à partir d'ARN extraits des sous-structures CA1/2, CA3 et Gyrus Denté, dorsales et ventrales, de l'hippocampe. L'ensemble de la procédure est représenté dans la Figure 38. Les six sous-structures ont été disséquées à partir de coupes de cerveaux par microdissection laser. Après microdissection, les tissus ont été collectés dans du tampon d'extraction d'ARN (Arcturus Picopure RNA isolation kit Applied Biosystems) et l'ARN a été extrait selon les instructions du kit Arcturus Picopure. Le microarray et son analyse ont été effectués par l'IGBMC, Plateforme Biopuces et Séquençage, Strasbourg, France, avec la technologie Affymetrix et la puce GeneChip® Mouse Gene 2.0. L'expression du BIN1 humain a été évaluée par RT-qPCR, et les résultats du microarray ont été vérifiés par cette même technique pour les gènes NR2B, Tiam2, et BIN1 souris.

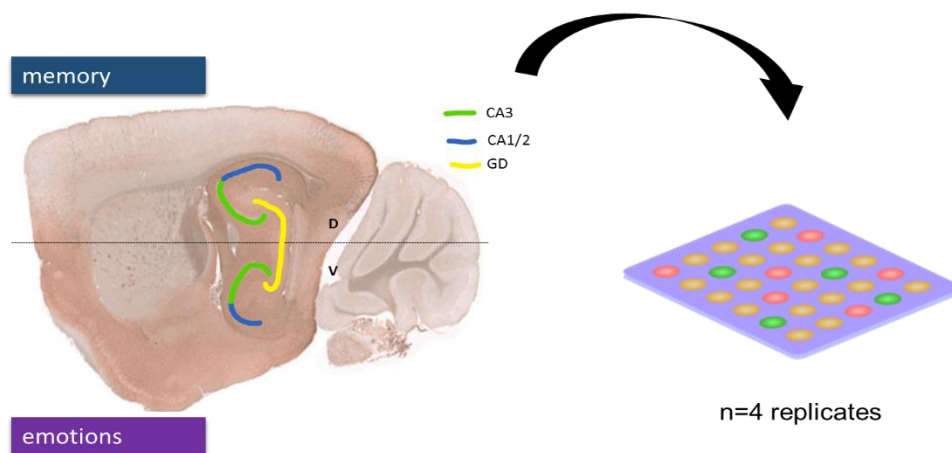


Figure 38 : Détection de l'expression génique dans les sous-structures de l'hippocampe des souris hBIN1

L'hippocampe est connu pour présenter une régionalisation dorso-ventrale de son implication dans la cognition. La partie dorsale serait majoritairement impliquée dans les processus de mémoire, tandis que la partie ventrale serait plus impliquée dans les processus émotionnels. A partir de coupes transversales de cerveau de souris fraîchement congelés (technique snap-frozen), les sous-structures CA1/2, CA3 et Gyrus Denté ont été microdisséquées au microdissecteur laser. L'ARN des tissus a directement été extrait et envoyé à une plateforme spécialisée pour effectuer une analyse microarray.

Electrophysiologie ex vivo

L'électrophysiologie a été effectuée par Patrick Dutar (enregistrements des potentiels de champ, sur tranches) et Brigitte Potier (Patch clamp sur cellule entière), INSERM U894, Centre de Psychiatrie et Neurosciences, Paris. Patrick Dutar a procédé à l'étude des courants pré- et post-synaptiques par l'enregistrement des PFV (presynaptic fiber volleys), des fEPSPs (field excitatory postsynaptic potentials) et de la PPF (paired-pulse facilitation) et a construit les courbes I/O (Input/Output). Il a également procédé aux expériences de LTP (Long Term Potentiation) et de LTD (Long Term Depression). Brigitte Potier a enregistré des courants toniques glutamate-dépendants ou GABA dépendants, ainsi que les activités miniatures spontanées (mEPSCs et mIPSCs). Ces expériences ont été menées à trois mois sur les synapses de la collatérale de Schaffer CA3-CA1 et de la voie perforante cortex entorhinal – Gyrus Denté, et à 19 mois sur la synapse de la voie perforante uniquement.

Comportement

Le comportement a été effectué par Damien Maréchal, Institut Clinique de la Souris (ICS) / Institut de Génétique et Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC), Illkirch.

Damien Maréchal a procédé à la caractérisation comportementale complète de la lignée hBIN1, de 3 à 18 mois. L'activité, l'anxiété et les capacités cognitives ont été évaluées à l'aide des tests suivants : Open Field, Rotarod, Novel Object Recognition, labyrinthe en croix surélevé, labyrinthe en Y, piscine de Morris et Fear conditioning (voir Matériel & Méthodes de l'article 1).

RESULTATS

Les objectifs de la thèse ont abouti à un ensemble de résultats regroupés ici en deux grandes parties en fonction des publications dont ils feront l'objet. Les résultats de la première partie correspondent à un article soumis à publication. Les résultats de la seconde partie donneront lieu à un article, qui n'est pas encore finalisé.

PARTIE I : La souris hBIN1, modèle de la phase pré-clinique de la maladie d'Alzheimer à début tardif

Introduction

La Maladie d'Alzheimer Sporadique (MAS) est à ce jour la cause majoritaire de démence à travers le monde (Wu et al., 2012). Cette pathologie, pour laquelle aucun traitement n'a encore été trouvé, représente ainsi un véritable défi social et économique (Querfurth and LaFerla, 2010). Les études visant à élucider ses mécanismes moléculaires se basent d'une façon quasi exclusive sur des modèles animaux de la forme familiale qui ne représente pourtant que 2% des cas de Maladie d'Alzheimer (MA). Le gène BIN1 (Bridging Integrator 1), aussi appelé Amphiphysin 2, a été identifié par des études de Genome Wide Association Studies (GWAS) comme le locus de susceptibilité le plus important pour la MAS après le locus APOE (Kamboh et al., 2012; Naj et al., 2011; Seshadri et al., 2010).

BIN1 est un gène à l'expression complexe subissant un épissage alternatif important. Ses isoformes neuronales sont principalement connues pour leur rôle dans l'endocytose clathrine-dépendante à la terminaison axonale. BIN1 interviendrait dans la préparation du bourgeonnement des vésicules pré-synaptiques, notamment via ses interactions avec les phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PtdIns(4,5)P₂) de la membrane plasmique, la Dynamine (Picas et al., 2014) et l'Amphiphysine 1 (Di Paolo et al., 2002). Cette protéine participerait également à l'endocytose à la membrane des organites comme l'appareil de Golgi (Huser et al., 2013) et serait impliquée dans le trafic intracytoplasmique des endosomes (Leprince et al., 2003). Bien que le gène BIN1 ait été associé à des altérations du cortex entorhinal et de l'hippocampe (Biffi et al., 2010; Zhang et al., 2015) et à des atteintes cognitives (Vivot et al., 2015; Zhang et al., 2015), l'implication de la protéine dans la physiopathologie de la MA reste floue.

Les différents Single Nucleotide Polymorphism (SNPs) significatifs identifiés par les GWAS sont tous situés en dehors de la région codante du gène. L'explication la plus parcimonieuse du rôle de ces polymorphismes est qu'ils modifient l'expression du gène *BIN1*, comme montré dans Chapuis et al., 2013.

Nous montrons ici que la surexpression du gène humain BIN1 dans un modèle souris, qui mime ce qui est trouvé chez les patients, induit le développement de caractéristiques histopathologiques et comportementales typiques du stade pré-clinique de la MA. Le modèle hBIN1 présente une atteinte spécifique de la voie perforante associée à une altération de la mémoire de reconnaissance et de la capacité à différencier finement deux contextes. Nous démontrons que BIN1 est présent à l'épine dendritique et interagit avec les protéines N-WASP, CLIP-1 et Tiam1, impliquées dans la morphologie dendritique et synaptique via la voie Rac1. Nous montrons que cette voie est dérégulée dans le gyrus denté des souris hBIN1 et que cette dérégulation est associée à une perte des épines matures au profit d'une augmentation des épines immatures.

Article 1: BIN1 BAC transgenic mice display typical early phenotypes of presymptomatic Alzheimer's disease

BIN1 BAC transgenic mice display typical early phenotypes of presymptomatic Alzheimer disease

Daudin R¹, Marechal D^{2,3,4}, Bourg N⁵, Loe-Mie Y¹, Potier B¹, Dutar P¹, Viard, J. ¹, Lepagnol-Bestel A.M¹, Hindié V⁶, Birling MC⁷, Lindner L⁷, Chevalier C^{2,3,4}, Pavlovic G⁷, Dupuis G⁵, Lévêque-Fort⁵, Diaz J¹, Davenas, E¹, Dembele D^{2,3,4} Thibault-Carpentier C^{2,3,4}, Rain J.C⁶, Herault Y^{2,3,4,7*} & Simonneau M^{1, 8, 9*!}

¹Centre Psychiatrie & Neurosciences, INSERM U894, 75014 Paris, France

² Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, 1 rue Laurent Fries, 67404 Illkirch, France

³Centre National de la Recherche Scientifique, UMR7104, Illkirch, France

⁴Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, U964, Illkirch, France

⁵Institut des Sciences Moléculaires d'Orsay (ISMO), CNRS UMR 8214, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay 91405, France.

⁶ HYBRIGENICS, Impasse Reille, 75014 Paris, France

⁷PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris, ICS; GIE CERBM, CNRS, INSERM, University of Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France

⁸ LAC, UMR CNRS-ENS de Cachan, Université Paris-Saclay, Orsay, France

⁹Département de Biologie, ENS de Cachan, Université Paris-Saclay, France

* Senior co-authors

! Corresponding author

Abstract

Mouse models reproducing the molecular and phenotypic features of late-onset Alzheimer disease are urgently required, to determine the impact of the recently identified genetic risk factors on this disease and to facilitate the development of treatments. We describe here transgenic mice carrying a bacterial artificial chromosome containing the full human *BIN1* gene, mimicking the changes in *BIN1* expression found in patients. These mice display specific early impairment of entorhinal cortex-dentate gyrus synaptic plasticity in the hippocampus, with abnormal object recognition followed by impaired pattern recognition. These phenotypes involve changes to the BIN1/TIAM/RAC1 pathway in the dendritic spines of the dorsal dentate gyrus. This work opens up new avenues of investigation into the pathogenic mechanisms of Alzheimer disease, and points to a molecular mechanism that can be targeted for therapeutic purposes.

Late-onset Alzheimer disease (LOAD) is the most common form of dementia and one of the most challenging diseases of modern society (Querfurth & LaFerla, 2010). No treatment of demonstrated efficacy is currently available, undoubtedly due to the lack of identified early druggable molecular targets (Small, 2014). Genetic factors are thought to influence the individual risk of LOAD, but only a few specific polymorphisms have been identified. *APOE* (encoding apolipoprotein E) is the principal locus identified as having a large effect on LOAD risk (Strittmatter *et al.*, 1993). Other single-nucleotide polymorphisms (SNPs) have also been implicated in LOAD, in recent genome-wide association studies (GWAS), but the SNPs concerned had only modest effects (Lambert *et al.*, 2013; Karch *et al.*, 2014). The identification of these new susceptibility genes has suggested the involvement of new pathways in LOAD pathophysiology: immune system function, cholesterol metabolism, synaptic dysfunction and cell membrane processes involving the bridging integrator 1 (BIN1). *BIN1* is the second most important risk locus for LOAD after *APOE*. Variants of both *APOE* and *BIN1* have been associated with cognitive defects (Caselli *et al.*, 2009; Vivot *et al.*, 2015; Zhang *et al.*, 2015).

Our working hypothesis was that mimicking the changes in *BIN1* expression observed in LOAD patients in transgenic mice would generate a sequence of intermediate phenotypic changes

linked to cognition, facilitating analysis of the molecular pathophysiological changes occurring in LOAD.

We first analyzed the changes in *BIN1* expression observed in postmortem brain tissues from LOAD patients. The *BIN1* SNP associated with LOAD is located 28 kb upstream from the *BIN1* coding region (Lambert *et al.*, 2013), suggesting that changes in *BIN1* expression may be responsible for increasing the risk of LOAD (Chapuis *et al.*, 2013). We analyzed two datasets of *BIN1* transcript levels (Zhang *et al.*, 2013; Myers, PNAS ref) in the brains of LOAD patients or human controls. We found that *BIN1* transcript levels were higher in the brains of LOAD cases than in those of controls (Figure 1A-B). Taking these expression data into account, we generated transgenic mouse lines displaying slight *BIN1* overexpression, using a 79239 bp human BAC containing only the *BIN1* gene (Fig. 1C). We selected a line displaying a three-fold increase in *BIN1* mRNA levels (Fig. 1D), to mimic the slight increase in *BIN1* expression observed in LOAD patients.

We investigated synaptic transmission and plasticity in hippocampal slices from these mice at the age of three months. An analysis of synapses between CA3 and CA1 indicated no change in long-term potentiation (LTP) in BAC-*BIN1* mice, which had input-output curves indistinguishable from their control littermates (Fig. 1 F-G). By contrast, stimulation of the entorhinal cortex (EC) perforant path (PP), with recording of the population responses in the dorsal dentate gyrus (DG), showed that LTP was impaired in BAC-*BIN1* mice. The slope of the input-output curve for our mutant animals was smaller than that for wild-type animals (Fig. 1 H-I). Thus, BAC-*BIN1* mice displayed an early contrasted synaptic plasticity phenotype limited to EC-DG synapses, at the age of three months.

We then analyzed possible cognitive deficits in BAC-*BIN1* mice. The DG may play a role in both novelty-encoding and context discrimination, by helping to extract the novel features of an environment and to facilitate the storage of similar experiences as separate representations (Deng *et al.*, 2010; Wilson *et al.*, 2013; Knierim, 2015). BAC-*BIN1* mice displayed impaired novelty exploration, which manifested as a decrease in novel object exploration at the ages of six and nine months (Fig. 2A-B). By contrast, spatial long-term memory, which was assessed with the Morris Water Maze, was normal at both nine and 12 months of age (Fig. 2C-D). We

used a variant of the fear conditioning test to assess hippocampal pattern separation memory (McHugh *et al.*, 2007). This task separates the spatial and temporal contributions to the memory associated with an external stimulus (foot shock). Both wild-type and transgenic mice were able to recall where they received the shock at nine months of age (Fig. 2E). By contrast, only wild-type mice could recall context A at 15 months; BAC-BIN1 mice had the same freezing time in both contexts, which differed only slightly (Fig. 2F). These findings indicate that BAC-BIN1 mice have a normal spatial explicit memory, but a specific impairment of recognition memory at month 9 for novel object exploration and at month 19 for subtle discrimination between the specific features of two contexts. These features are consistent with defects of the perirhinal-lateral entorhinal cortex-dentate gyrus pathway (Knierim, 2015).

We investigated the molecular mechanism underlying these phenotypes, by studying the localization of BIN1 at synapses with an improved direct stochastic optical resolution microscopy (dSTORM) technique (Bourg *et al.*, 2016) (Fig. 3A). We detected BIN1 protein in both pre- and post-synapses, and the number of molecules in the post-synapse compartment was twice that in the presynaptic compartment (Fig. 3B). Using mass spectrometry on synaptosomes and BIN1 immunoprecipitation (Supplementary Fig. 3), we were able to show that BIN1 interacted with proteins from the pre- or postsynaptic complexes. We stained the hippocampal slices by biolistic Dil injection for analysis of the dendritic spines of the dorsal DG. We observed an increase in the number of filopodia and a decrease in the number of mature spines, at both three and 19 months of age, in the BAC-BIN1 mice, consistent with a decrease in the number of functional spines in these mice (Fig. 3C-D). Decreases in DG neurogenesis have been reported to affect pattern separation, with smaller numbers of Grin2b receptors on adult-born DG neurons (Deng *et al.*, 2010; Kheirbek *et al.*, 2012). We therefore analyzed adult neurogenesis and transcriptome changes in subregions of the hippocampus, by laser-assisted microdissection. We found an increase in adult neurogenesis (Fig. 3E) and an increase in *grin2b* transcript levels in both the dorsal and ventral DG (Fig. 3D), suggesting that a decrease in adult DG neurogenesis cannot account for the phenotypes reported here.

We further analyzed the molecular mechanisms responsible for spinal deterioration in the BAC-BIN1 mice. Our yeast two-hybrid studies and Biogrid data showed that BIN1 interacted with N-WASP, NUFIP1, CLIP1, and with three Rho/Rac1 guanine nucleotide exchange factors (GEFs) involved in dendritic spine and/or neurite growth: KALRN, TIAM1 and TIAM2 (refs) (Fig. 4A). These interactions were validated by proximity ligation assays, with larger numbers of interactions detected for Bin1/N-Wasp and Bin1/Clip1 (Fig. 4B-C). We carried out laser-assisted microdissection and transcriptome analysis of the various dorsal and ventral subregions of the hippocampus in both BAC-BIN1 and control mice (Fig. 3D). We found that the Rho/Rac guanyl-nucleotide exchange factor (GO:0005089) Gene Ontology repertoire displayed covariation with these subregions Fig. 4D; GO:0005089~Rho guanyl-nucleotide exchange factor activity). All the Rac1-GEFs are known to control the activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines (Xie et al., 2007; ref Penzes). Tiam2 levels were found to be significantly higher in the dorsal DG, and this increase was validated by RT-qPCR (Fig. 4E). This increase in GEF transcript levels suggests that there was also an increase in the levels of active forms of Rac1. We confirmed this hypothesis by comparing GFP-Rac1 expression throughout the hippocampus between BAC-BIN and control mice (Fig. 4F). These findings are consistent with a persistent increase in Rac1 activity in the dendritic spines of BAC-BIN1 mice. It has been reported that such increases, due to the production of a constitutively active form of Rac1 (Luo *et al.*, 1996; Tashiro *et al.*, 2000) or changes in the stoichiometry of the Rac1-dependent signalosome, as reported for the Disc1/PSD95/Rac1 signalosome (Hayashi-Takagi A, *et al.* (2010)), induce abnormal spines (as shown in Fig. 3C). This deregulation of Rac1 can induce changes in actin polymerization, leading to changes in both spine morphology (Caroni *et al.*, 2012) and LTP (Rust *et al.*, 2010).

Discussion

We used a BAC-BIN1 transgenic line overexpressing *BIN1* to identify a sequence of phenotypes linked to cognition. This sequence begins with a defect in functional plasticity (LTP) and the morphology of synapses located between the entorhinal cortex and dentate gyrus at three months. There is then an absence of novel object recognition at six months and abnormal contextual pattern separation at 15 months. By contrast, long-term spatial memory was intact at the assessments at nine and 12 months. These results point to a defect in the perirhinal-

lateral entorhinal cortex-dentate gyrus pathway, which integrates the recognition of objects and features, rather than in the postrhinal-medial entorhinal cortex-dentate gyrus pathway, which integrates spatial information (Knierim, 2015). Clinical studies have recently shown that the lateral entorhinal cortex is the first structure to be affected LOAD (Khan *et al.*, 2013; Small, 2014). Together, these results indicate that the BAC-BIN1 mouse model displays key characteristics of LOAD, with a specific and early impact on the lateral entorhinal cortex. By contrast, models of early-onset Alzheimer disease, which are widely used, particularly for the rescue of relevant cognitive phenotypes (Cisse *et al.*, 2011; Roy *et al.*, 2016), display no specific impact on synaptic plasticity, with changes in long-term potentiation in both CA3-CA1 synapses and entorhinal cortex-dentate gyrus synapses (Oddo *et al.*, 2003).

Humanized *APOE4*-transgenic mice, the only other mouse model available for LOAD, display alterations to adult DG neurogenesis due to GABAergic imbalance (Sun *et al.*, 2009). This impaired DG neurogenesis affects pattern recognition (Clelland *et al.*, 2009), contrasting with the changes observed here in BAC-BIN1 transgenic mice. Together, the results obtained for *APOE4* and BAC-BIN1 transgenic mice suggest that genetic risk factors independently affect multiple pathways converging on hippocampus microcircuits. The finding that the BIN1/TIAM1/RAC1/F-actin pathway is deregulated in our transgenic model may be instrumental to the development of novel therapeutic strategies for these early preclinical stages of LOAD, which are the only stages amenable to treatment. This work opens up new avenues of investigation into the pathogenic mechanisms of Alzheimer disease, and points to a previously unknown mechanism that can be targeted for therapeutic purposes.

References

- Bourg, N., Mayet, C., Dupuis, G., Barroca, T., Bon, P., Lécart, S., Fort, E., and Lévêque-Fort, S. (2015). Direct optical nanoscopy with axially localized detection. *Nat. Photonics* 9, 587–593.
- Caroni, P., Donato, F., and Muller, D. (2012). Structural plasticity upon learning: regulation and functions. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 478–490.
- Caselli, R.J., Dueck, A.C., Osborne, D., Sabbagh, M.N., Connor, D.J., Ahern, G.L., Baxter, L.C., Rapcsak, S.Z., Shi, J., Woodruff, B.K., et al. (2009). Longitudinal modeling of age-related memory decline and the *APOE* epsilon4 effect. *N. Engl. J. Med.* 361, 255–263.

- Chapuis, J., Hansmannel, F., Gistelink, M., Mounier, A., Van Cauwenberghe, C., Kolen, K.V., Geller, F., Sottejeau, Y., Harold, D., Dourlen, P., et al. (2013). Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol. Psychiatry* *18*, 1225–1234.
- Cissé, M., Halabisky, B., Harris, J., Devidze, N., Dubal, D.B., Sun, B., Orr, A., Lotz, G., Kim, D.H., Hamto, P., et al. (2011). Reversing EphB2 depletion rescues cognitive functions in Alzheimer model. *Nature* *469*, 47–52.
- Clelland, C.D., Choi, M., Romberg, C., Clemenson, G.D., Fragniere, A., Tyers, P., Jessberger, S., Saksida, L.M., Barker, R.A., Gage, F.H., et al. (2009). A functional role for adult hippocampal neurogenesis in spatial pattern separation. *Science* *325*, 210–213.
- Deng, W., Aimone, J.B., and Gage, F.H. (2010). New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat. Rev. Neurosci.* *11*, 339–350.
- Goto, A., Hoshino, M., Matsuda, M., and Nakamura, T. (2011). Phosphorylation of STEF/Tiam2 by protein kinase A is critical for Rac1 activation and neurite outgrowth in dibutyl cAMP-treated PC12D cells. *Mol. Biol. Cell* *22*, 1780–1790.
- Hayashi-Takagi, A., Takaki, M., Graziane, N., Seshadri, S., Murdoch, H., Dunlop, A.J., Makino, Y., Seshadri, A.J., Ishizuka, K., Srivastava, D.P., et al. (2010). Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat. Neurosci.* *13*, 327–332.
- Karch, C.M., Cruchaga, C., and Goate, A.M. (2014). Alzheimer's Disease Genetics: From the Bench to the Clinic. *Neuron* *83*, 11–26.
- Khan, U.A., Liu, L., Provenzano, F.A., Berman, D.E., Profaci, C.P., Sloan, R., Mayeux, R., Duff, K.E., and Small, S.A. (2014). Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* *17*, 304–311.
- Kheirbek, M.A., Tannenholz, L., and Hen, R. (2012). NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 8696–8702.
- Knierim, J.J. (2015). The hippocampus. *Curr. Biol.* *25*, R1116–R1121.
- Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A.L., Bis, J.C., Beecham, G.W., Grenier-Boley, B., et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *45*, 1452–1458.
- Luo, L., Hensch, T.K., Ackerman, L., Barbel, S., Jan, L.Y., and Nung Jan, Y. (1996). Differential effects of the Rac GTPase on Purkinje cell axons and dendritic trunks and spines. *Nature* *379*, 837–840.

- McHugh, T.J., Jones, M.W., Quinn, J.J., Balthasar, N., Coppari, R., Elmquist, J.K., Lowell, B.B., Fanselow, M.S., Wilson, M.A., and Tonegawa, S. (2007). Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317, 94–99.
- Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 24, 1063–1070.
- Penzes, P., and Remmers, C. (2012). Kalirin signaling: implications for synaptic pathology. *Mol. Neurobiol.* 45, 109–118.
- Penzes, P., Cahill, M.E., Jones, K.A., and Srivastava, D.P. (2008). Convergent CaMK and RacGEF signals control dendritic structure and function. *Trends Cell Biol.* 18, 405–413.
- Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.
- Roy, D.S., Arons, A., Mitchell, T.I., Pignatelli, M., Ryan, T.J., and Tonegawa, S. (2016). Memory retrieval by activating engram cells in mouse models of early Alzheimer's disease. *Nature* 531, 508–512.
- Rust, M.B., Gurniak, C.B., Renner, M., Vara, H., Morando, L., Görlich, A., Sassoè-Pognetto, M., Banhaabouchi, M.A., Giustetto, M., Triller, A., et al. (2010). Learning, AMPA receptor mobility and synaptic plasticity depend on n-cofilin-mediated actin dynamics. *EMBO J.* 29, 1889–1902.
- Small, S.A. (2014). Isolating pathogenic mechanisms embedded within the hippocampal circuit through regional vulnerability. *Neuron* 84, 32–39.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993). Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 1977–1981.
- Sun, B., Halabisky, B., Zhou, Y., Palop, J.J., Yu, G., Mucke, L., and Gan, L. (2009). Imbalance between GABAergic and Glutamatergic Transmission Impairs Adult Neurogenesis in an Animal Model of Alzheimer's Disease. *Cell Stem Cell* 5, 624–633.
- Tashiro, A., Minden, A., and Yuste, R. (2000). Regulation of dendritic spine morphology by the rho family of small GTPases: antagonistic roles of Rac and Rho. *Cereb. Cortex N. Y. N* 1991 10, 927–938.
- Um, K., Niu, S., Duman, J.G., Cheng, J.X., Tu, Y.-K., Schwechter, B., Liu, F., Hiles, L., Narayanan, A.S., Ash, R.T., et al. (2014). Dynamic control of excitatory synapse development by a Rac1 GEF/GAP regulatory complex. *Dev. Cell* 29, 701–715.
- Vivot, A., Glymour, M.M., Tzourio, C., Amouyel, P., Chêne, G., and Dufouil, C. (2015). Association of Alzheimer's related genotypes with cognitive decline in multiple domains: results from the Three-City Dijon study. *Mol. Psychiatry*.

Webster, J.A., Gibbs, J.R., Clarke, J., Ray, M., Zhang, W., Holmans, P., Rohrer, K., Zhao, A., Marlowe, L., Kaleem, M., et al. (2009). Genetic Control of Human Brain Transcript Expression in Alzheimer Disease. *Am. J. Hum. Genet.* *84*, 445–458.

Wilson, D.I.G., Langston, R.F., Schlesiger, M.I., Wagner, M., Watanabe, S., and Ainge, J.A. (2013). Lateral entorhinal cortex is critical for novel object-context recognition. *Hippocampus* *23*, 352–366.

Xie, Z., Srivastava, D.P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M.E., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Surmeier, D.J., and Penzes, P. (2007). Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* *56*, 640–656.

Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L.-G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelezchnikov, A.A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., et al. (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* *153*, 707–720.

Zhang, X., Yu, J.-T., Li, J., Wang, C., Tan, L., Liu, B., and Jiang, T. (2015). Bridging Integrator 1 (BIN1) Genotype Effects on Working Memory, Hippocampal Volume and Functional Connectivity in Young Healthy Individuals. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*

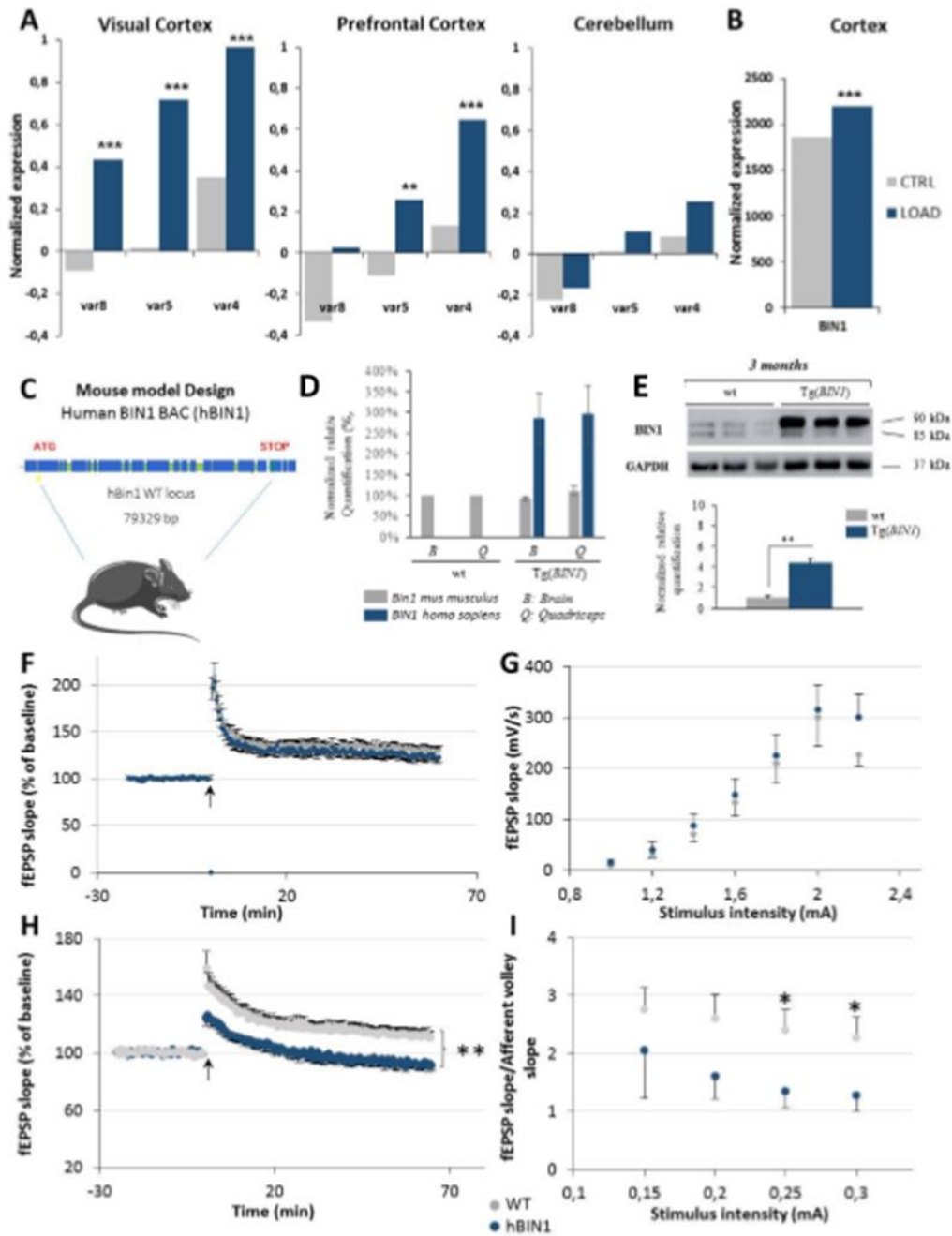


Figure 1. Mimicking, in transgenic mice, of the *BIN1* overexpression found in patients with LOAD, resulting in a specific synaptic plasticity defect

A-B. *BIN1* expression in patients (**A**) Microarray data for the visual cortex (VC), prefrontal cortex (PFC), and cerebellum, for *BIN1* variants 8, 5 and 4 ($n=129$ AD; $n=100$ controls). Zhang *et al.*, 2013. LIMMA Test. Bonferroni correction ($n=3$). ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$. (**B**) Microarray data for the cortex ($n=176$ LOAD; $n=188$ controls). Webster *et al.*, 2009. Wilcoxon Test. Unadjusted $P = 7.979E-06$. *** $p < 0.0005$.

C. Schematic representation of the hBIN1 (BAC-BIN1) mouse line.

D. Normalized expression of the murine and human variants of *Bin1* in the brain (B) and quadriceps (Q), in extracts from both wild-type (wt) and transgenic (Tg) mice. All percentage ratios were based on the level of *Bin1* RNA in wild-type samples.

E. Western-blot analyses on wt and Tg hippocampi at 3 months, showing an increase in the amount of the *BIN1* neuronal isoform with no change in the levels of the ubiquitous isoforms. Student *t*-test, ** ($p < 0.01$)

F-I. *In vivo* synaptic transmission and plasticity of BAC-BIN1 mice. Theta-burst stimulation of the CA3 input into the CA1-induced potentiation of fEPSP in control (grey circles) and transgenic (blue circles) mice (F). Theta-burst stimulation of the PP input into the DG-induced potentiation of fEPSP in control (grey circles), but not in transgenic (blue circles) mice (H). CA3-CA1 (G) and PP-GC input/output curves (I) for control (grey circles) and transgenic (blue circles) mice, showing fEPSP curve slopes. The error bars indicate the SEM.

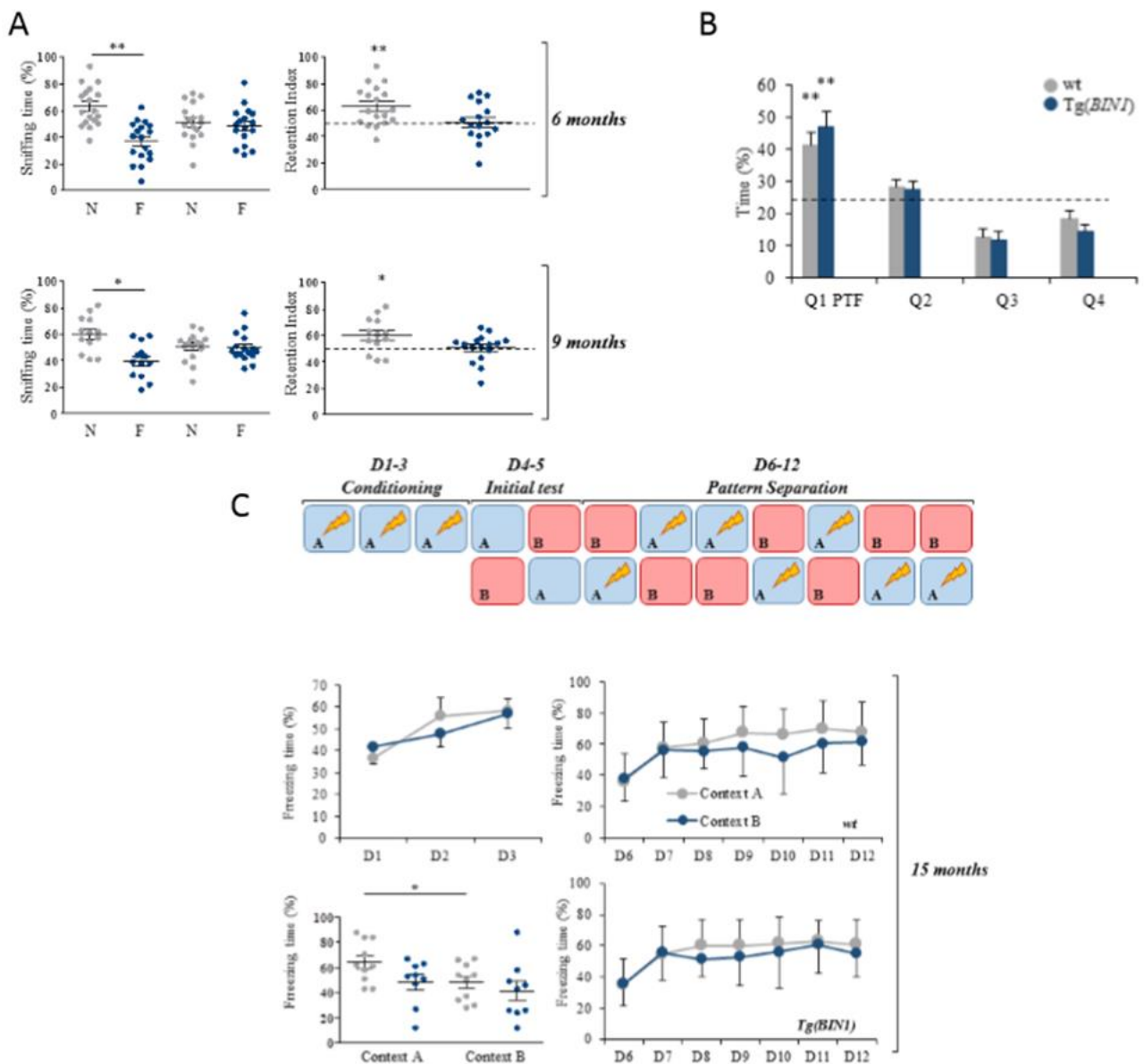


Figure 2. Sequential impact on recognition memory and then on contextual memory, with no change in spatial reference memory.

A: Recognition memory was altered in mice transgenic for human Bin1, from the age of six months. Impaired discrimination (see Methods) was observed at six and nine months of age (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

B: Spatial reference memory during learning sessions for the Morris Water Maze is not affected in mice transgenic for BIN1. We plotted here the time spent in the four virtual quadrants, a measure of spatial memory. Both wt and Tg(BIN1) mice spent significantly more time in the platform (PFT) quadrant than would be expected on the basis of chance alone (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

C: Tg(hBin1BIN1) mice displayed an impairment of contextual memory at 15 months of age. We assessed the ability of the mice to distinguish between two contexts on the basis of spatial and olfactory cues. Mice of both genotypes demonstrated correct conditioning learning at nine months (a) and 15 months (e) of age. On D4-5, freezing time was longer in context A than in context B for wild-type mice, at both time points. By contrast, no difference in freezing time between the two contexts was observed for Tg(Bin1BIN1) mice at the age of 15 months. An analysis of the discrimination protocol showed that wt and Tg mice displayed learning behavior at nine months (D10 to D12), whereas neither of the genotypes could recall context A from context B. (* $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$).

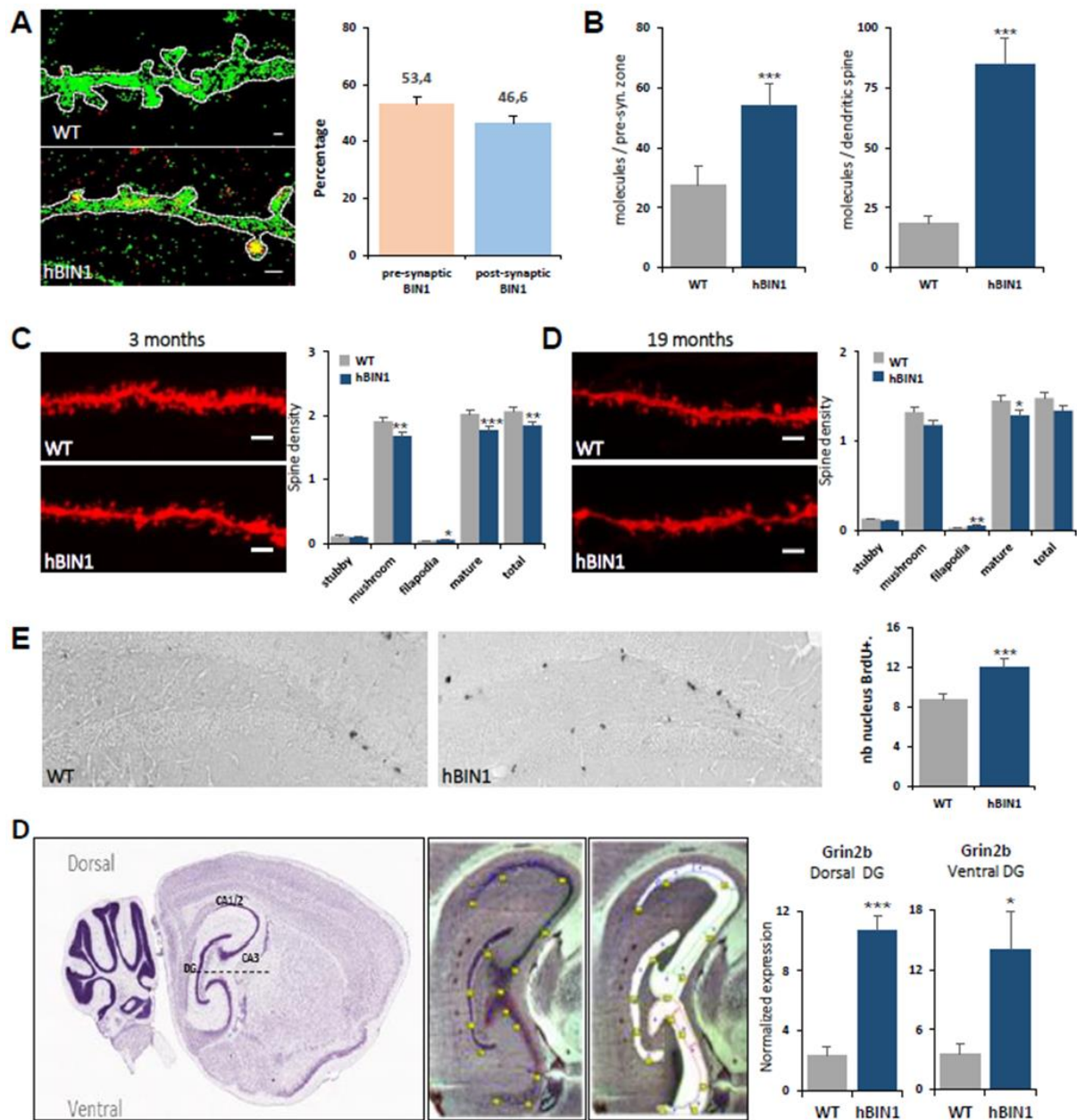


Figure 3. BIN1 is expressed in postsynaptic dendritic spines

A. d-STORM acquisition of BIN1 (red) and phalloidin (green) signals for WT and hBIN1 hippocampal neurons on day 21 *in vitro* (DIV21). Percentage of BIN1 molecules detected in the presynaptic and postsynaptic compartments for wild-type neurons. Scale bar = 0.5 μ m.

B. Quantification of BIN1 molecules by d-STORM in the pre- and postsynaptic compartments, for wt ($n=118$) and hBIN1 ($n=170$) neurons from $n=3$ wt and $n=4$ hBIN1 embryos. *** $p < 0.0005$.

C-D. Dil labeling of dorsal dentate gyrus granular cells from coronal slices of three- (C) and 19-month-old (D) mice. For each time point, labeling is shown for $n=3$ wt and $n=3$ hBIN1 mice, for > 8 dendrites per animal. Scale bar=2.5 μ m. * $p < 0.05$; ** $p < 0.005$; *** $p < 0.0005$.

E. BrdU labeling of the dorsal dentate gyrus of wt ($n=4$) and hBIN1 ($n=3$) mice, 4 h after injection. Scale bar=50 μ m. BrdU-positive nucleus count *** $p < 0.0005$.

F. Schematic representation and images of the hippocampal substructures separated by laser-assisted microdissection. The dorsal and ventral CA1/2, CA3 and dentate gyrus were microdissected from sagittal brain slices ($n=5$ WT; $n=5$ hBIN1). RT-qPCR for Grin2b, showing overexpression in the dorsal (*** $p < 0.0005$) and ventral (* $p < 0.05$) dentate gyrus (DG).

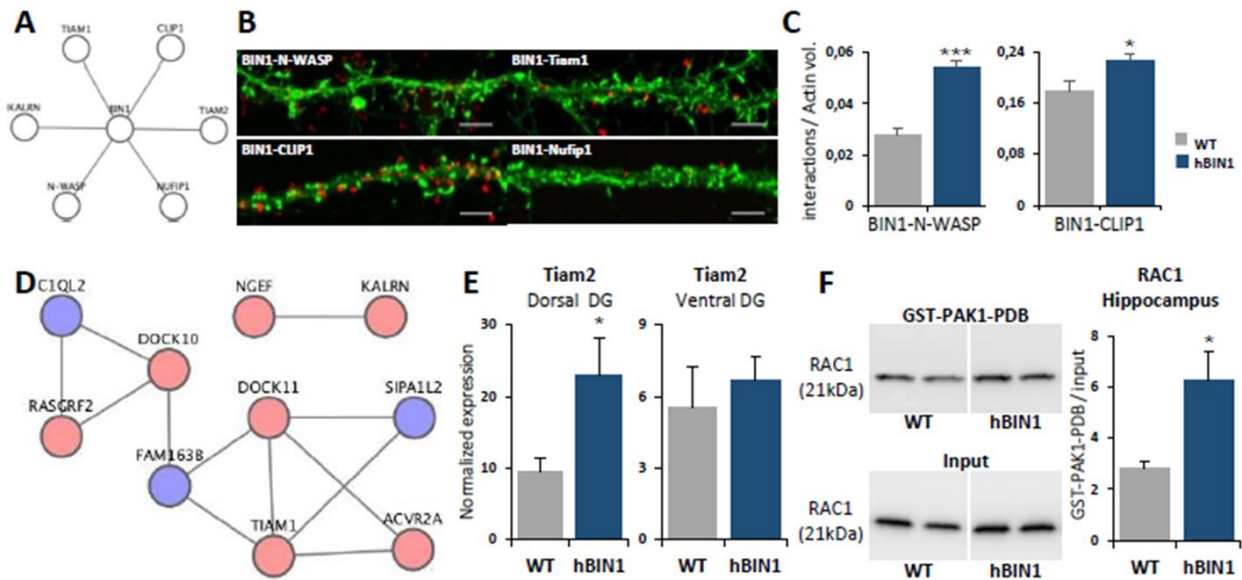


Figure 4. Impairment of the BIN1/TIAM/RAC1 pathway in BAC-BIN1 mice

A. Cytoscape of BIN1 interactions in yeast two-hybrid assays (Tiam1, KALRN, CLIP1) and Biogrid (N-WASP, Nufip1).

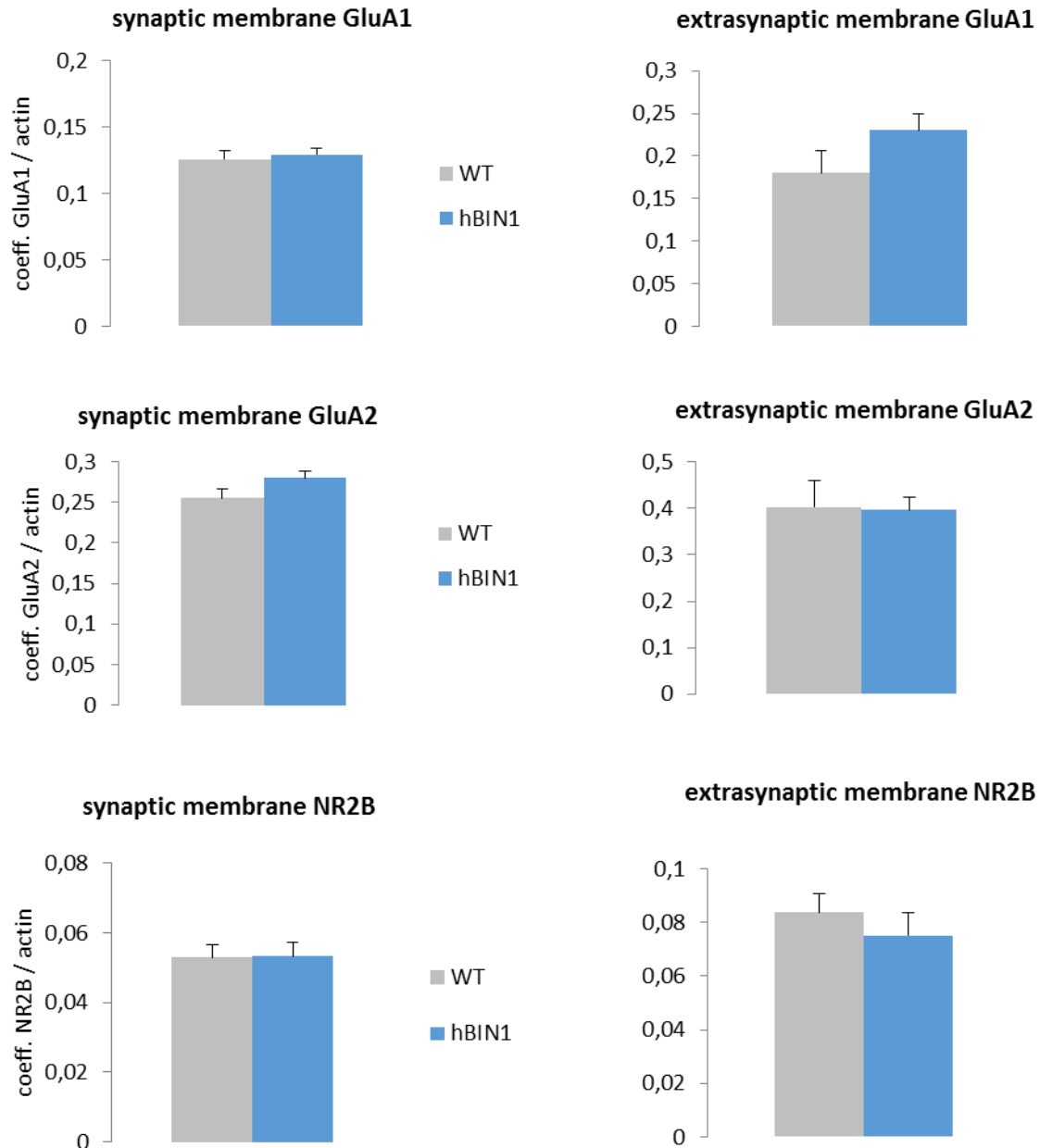
B. *In situ* proximity ligation assay (PLA; red) with anti-BIN1 and anti-CLIP1, anti-Tiam1 or anti-Nufip1 antibodies, dual labeling for actin (phalloidin, green) on wt mouse primary hippocampal neurons 21DIV. Scale bars=5 μ m.

C. Mean interaction PLA point numbers calculated for 70 μ m-long dendritic segments and normalized by actin volume for at least 10 neurons per embryo ($n=3$ WT; $n=3$ hBIN1). * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$.

D. Schematic representation of co-variation analysis results for the microarray assay performed with RNA from the hippocampus substructures separated by laser-assisted microdissection. Analysis for all structures in wt and hBIN1 mice ($n=10$).

E. RT-qPCR for Tiam2 showing overexpression specifically in the dorsal (***) $p < 0.05$) dentate gyrus (DG).

F. Western-blot analyses of GTP-Rac1 pulldown with the GST-PAK1-PDB fusion protein and total Rac1 from wt ($n=8$) and hBIN1 ($n=4$) hippocampi, showing an increase of the levels of active forms of Rac1 (* $p < 0.05$).



Supplementary Figure 1: Quantification of membrane glutamatergic receptors

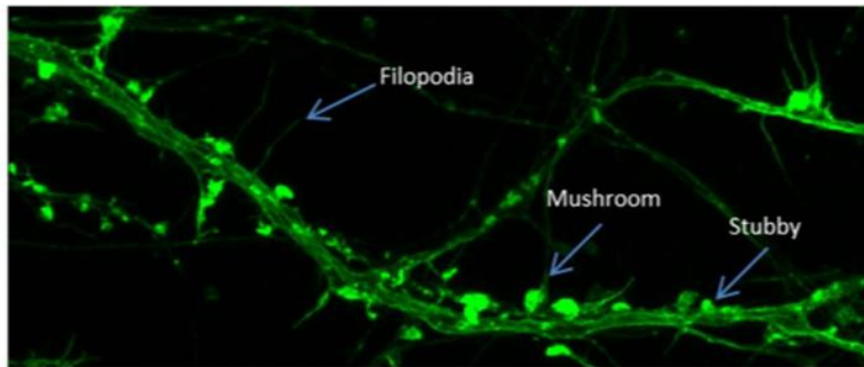
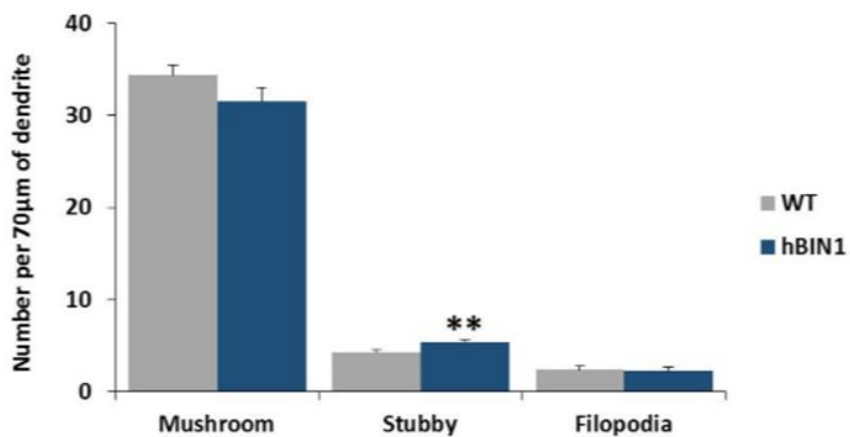
The GluA1, GluA2 and NR2B glutamatergic receptor subunits were quantified by colabeling receptors and actin on DIV21 hippocampal wt and hBIN1 neurons. Actin was labeled with phalloidin and glutamatergic receptors with antibodies against their extracellular fraction (no cell permeabilization during immunolabeling).

Synaptic and extrasynaptic zones were defined by tracing regions of interest (ROIs) on three-dimensional dendrite reconstructions from confocal images. Volumes (μm^3) of receptor and actin labeling were quantified within each ROI, with Volocity software. Results are expressed as the mean receptor volume normalized with respect to actin volume (coeff.=coefficient).

$n=3$ wt and $n=4$ hBIN1 embryos in each case. We studied at least 10 dendrites per embryo.

For synaptic receptors: GluA1, $n= 534$ wt $n= 992$ hBIN1 spines; GluA2, $n= 252$ wt $n=632$ hBIN1 spines; NR2B, $n= 520$ wt $n=846$ hBIN1 spines.

Statistics: no significant differences were detected in Wilcoxon rank sum tests with continuity correction or in two-sample Kolmogorov-Smirnov tests.

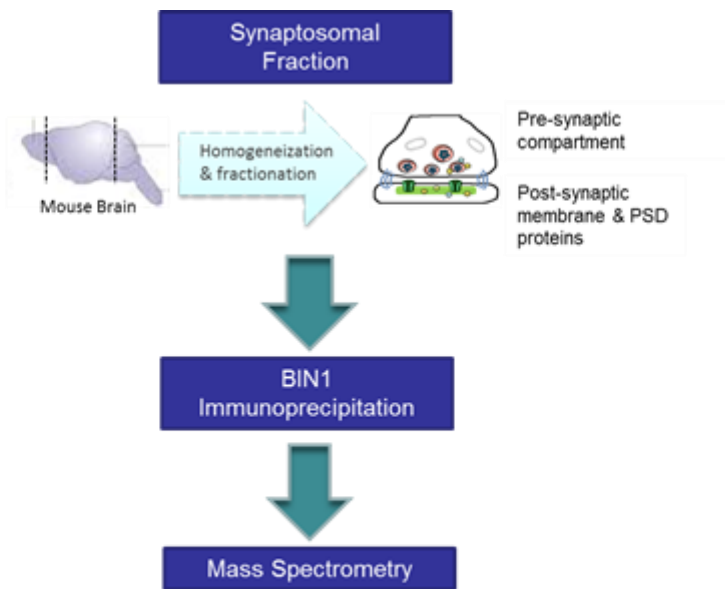
A**B**

Supplementary Figure 2: Spine morphology in wt and hBIN1 neurons

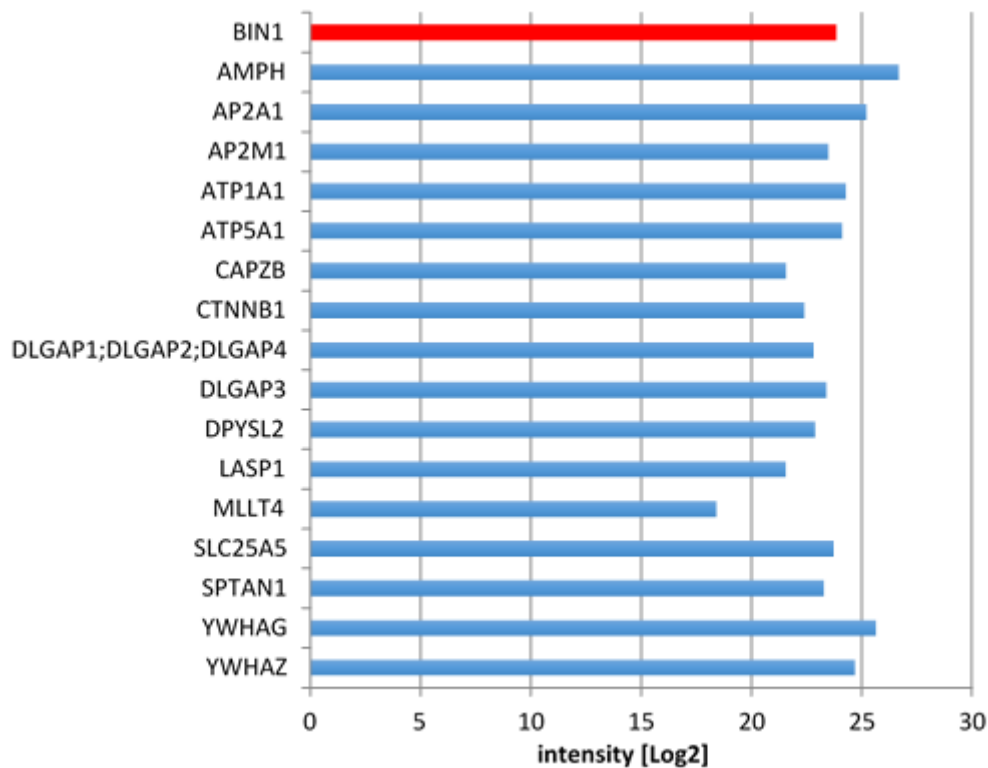
A. Image showing the typical spine morphology for mushroom, stubby and filopodial spines. Actin immunolabeling (phalloidin) was used to assess spine shape. Confocal analysis: 63x magnification with z-stacks from the top to the bottom of the dendrite, for 3D reconstruction.

B. Spine quantification. Stubby spines were significantly more frequent in hBIN1 neurons than in wt neurons (wt: 4.26; hBIN1: 5.36 ; $**p = 0.029$), mushroom-shaped spines were slightly less frequent in hBIN1 neurons, but this difference was not statistically significant (wt: 34.4; hBIN1: 31.5; $p = 0.129$) and the frequency of filopodial spines was similar for the two two phenotypes. Mean number (nb) of spines for a 70 μm-long dendrite. We analyzed at least five dendrites per embryo; $n=5$ wt $n=7$ hBIN1 embryos.

A.



B.



Supplementary Figure 3: BIN1 IP LC/MS/MS analysis of the mouse synaptosomal fraction

A. Schematic representation of the whole procedure. We used 10 mg protein from the wt synaptosomal fraction for endogenous immunoprecipitation with an anti-BIN1 antibody or mouse IgG.

B. Bar graph representing the proteins found specifically in the BIN1 IP samples and the intensity of their signals. Only proteins represented by more than one peptide in the final analysis are shown.

Materials and Methods

Primary cell culture

E17.5 hippocampal neurons were dissociated by enzyme treatment (0.25% trypsin, 37°C) and mechanically triturated with a P1000 tip in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% SVF, 0.5 mM Glutamax (Invitrogen), and 5 U/ml penicillin-streptomycin (Invitrogen). Cells were plated on glass coverslips coated with poly-DL-ornithine (Sigma), in Neurobasal® medium (Invitrogen) supplemented with 0.5 mM Glutamax (Invitrogen) and B27 1X (Invitrogen), in 24-well plates (7.10-E4 cells per well). Experiments were carried out after 15-21 days *in vitro* (DIV).

d-STORM

Immunolabeling

Cells were fixed by incubation for 20 minutes at room temperature in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS). They were rinsed in PBS and permeabilized with 0.5% Tween, 3% BSA, 1xPBS. The neurons were then incubated with the anti-BIN1 99D primary antibody diluted 1/250 in the permeabilization buffer, for 1.5 hours at 37°C. The cells were then rinsed and incubated with goat anti-mouse 647 antibody (1/1000, Life Technologies) in 1% BSA, 1xPBS for 45 minutes at 37°C. Actin was then labeled with phalloidin Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific), and the cells were immersed in the imaging buffer (see below).

Optical set-up

Super-resolution fluorescence microscopy images were acquired with a Nikon Eclipse Ti inverted microscope and the Perfect Focus System, configured for these TIRF excitation studies. Samples were excited sequentially with optically pumped semiconductor lasers at 637 nm and 488 nm (Obis 637 LX 140 mW, Coherent and Genesis MX-STM 500 mW, Coherent, respectively). A set of full-multiband laser filters, optimized for 405-, 488-, 561- and 635-nm laser sources (LF405/488/561/635-A-000, Semrock), was used to excite Alexa Fluor 488 and Alexa Fluor 647, and to collect the resulting fluorescence via a Nikon APO TIRF 60x, NA 1.49 oil immersion objective lens. All images were recorded with a 512×512-pixels EMCCD camera (iXon 897, Andor), split into two regions, each with an area of 256×256-pixels, positioned on the focal plane of an optical microscope for optimal sampling of the point spread function (2.7x magnification, optical pixel size of ~100 nm). Laser power at 488 nm and 637 nm was 140 mW, measured in the back focal plane. For each frame (~1500 recorded), integration time was set to 50 ms and EMCCD gain was set to 150.

Imaging buffer

During dSTORM acquisitions, the samples were immersed in an imaging buffer allowing fluorophore blinking whilst limiting photobleaching [1,2]. This buffer contained 50-100 mM β-mercaptoethylamine (MEA, Sigma-Aldrich) and an oxygen scavenger system (0.5 mg.ml⁻¹ glucose oxidase (Sigma-Aldrich), 40 μg.ml⁻¹ catalase (Sigma-Aldrich) and 10% (w/v) glucose) dissolved in a buffer composed of 100 mM Tris-HCl (Sigma-Aldrich), 1 mM ascorbic acid

(Sigma-Aldrich) and 1 mM methyl viologen (Sigma-Aldrich). The pH of the final solution was adjusted to 7.5.

dSTORM imaging

We induced the dark state in most of the fluorophores, by exciting the samples with the laser in an oblique configuration (637 nm for Bin1 immunolabeled with Alexa Fluor 647, then 488 nm for F-actin labeled with phalloidin Alexa Fluor 488). Once an appropriate density of the fluorescent dye molecules had been reached (typically, $< 1 \text{ molecule} \cdot \mu\text{m}^{-2}$), we switched to TIRF excitation with an irradiance of $2 \text{ kW} \cdot \text{cm}^{-2}$ and activated our in-house real-time super-resolution microscopy software. This software was written in Python, using the PyQt, Numpy and Scipy libraries, and is based on image wavelet-segmentation and centroid determination [3]. This algorithm provides dSTORM images with localization to within 15 nm. Drift correction was performed with the redundant cross-correlation algorithm developed by Wang *et al.* [4]. Moreover, to improve viewing quality, each detection of a single molecule was added to the final dSTORM image as a 2D Gaussian function with width of 15 nm.

Data analysis

For analysis of the location (pre- or postsynaptic) of the BIN1 protein, we first manually selected synapses of interest on the F-actin image. For each synapse of interest (considered as a ROI), we determined the contour of the dendritic spine (postsynaptic region) automatically, with our in-house software written in Python. This contour of the dendritic spine was then used for the super-resolution localization of the presynaptic region with a synaptic cleft of 30 nm. Finally, the superlocalization data for the post- and presynaptic regions were used to determine the location of the BIN1 protein.

References

- [1] van de Linde, S, et al., Direct stochastic optical reconstruction microscopy with standard fluorescent probes, *Nature Protocols*, Vol. 6, pp. 991-1009 (2011).
- [2] Vaughan, Joshua C, Jia, Shu and Zhuang, Xiaowei, Ultrabright photoactivatable fluorophores created by reductive caging, *Nature Methods*, Vol. 9, pp. 1181-1184 (2012).
- [3] Izeddin, I, et al., Wavelet analysis for single molecule localization microscopy, *Optics Express*, Vol. 20, pp. 2081-95 (2012).
- [4] Wang, Y, et al., Localization events-based sample drift correction for localization microscopy with redundant cross-correlation algorithm, *Optics Express*, Vol. 22, pp. 15982-15991 (2014).

LC/MS/MS

Sample preparation

LC/MS/MS experiments were carried out on BIN1 immunoprecipitates from the synaptosomal fraction. We used 10 mg of protein in each experiment. In the first experiment, we processed all the protein in one go. In the second and third experiments, we split the protein into 25 subsamples, which were processed separately, with pooling of the eluates at the end. Protein G magnetic beads were crosslinked to anti-BIN1 antibody or mouse IgG. Precleared lysates

were incubated with the antibody-bead complexes overnight (first and second experiments) or for 2 h (third experiment), with shaking, at 4°C. The supernatants were collected and the beads were washed three times in 150 mM NaCl, 1% NP40, 10 mM Tris pH 7.5. The proteins bound to the beads were eluted with 0.5% SDS in 1xPBS (first and second experiments) or with 3% SDS in 1xPBS (third experiment) for 10 minutes at 95°C.

LC/MS/MS was carried out by Dualsystems Biotech AG, Schlieren, Switzerland (www.dualsystems.com). Samples for mass spectrometry analysis were processed according to a filter-aided sample preparation (FASP) protocol (Wisniewski JR, 2009). In brief, affinity purification eluates were denatured with 6 M urea, reduced by incubation with 50 mM DTT for 30 minutes at 37°C and then alkylated by incubation with 200 mM iodoacetamide for 30 minutes at room temperature. The samples were then loaded onto a standard filtration device (30 kDa MWCO; VivaCon 500, Sartorius) and centrifuged at 14,000 x *g* for 15 minutes at 20°C. Buffer exchange was then performed by adding 8 M urea to the samples and repeating the centrifugation step (four centrifugations in total). We added ammonium bicarbonate and 1 µg trypsin (proteomics grade, Sigma) to the samples for protein digestion overnight at 37°C. The tryptic peptides were collected by centrifugation, and washed three times in 40 mM ammonium bicarbonate. The tryptic peptides were acidified by the addition of trifluoroacetic acid (Sigma) to a concentration of 1% and desalted by centrifugation on MicroSpin C18 Silica columns (The Nest Group. Inc.) according to the manufacturer's protocol.

Liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)

The tryptic peptides were analyzed on a LTQ Orbitrap XL (Thermo Fisher Scientific) mass spectrometer fitted with a nanoelectrospray ion source (Thermo Fisher Scientific). The peptide samples were separated by reverse-phase chromatography on a high-performance liquid chromatography column with an inner diameter of 75 µm (Michrom Bioresources) packed with 10 cm of stationary phase (Magic C18AQ, 200 Å, 3 µm, Michrom Bioresources) and connected to an EASY-nLC 1000 (Thermo Fisher Scientific) nano-flow HPLC. Peptides were loaded onto the column in 95% buffer A (98% H₂O, 2% acetonitrile, 0.1% formic acid) and eluted at a flow rate of 300 nl/min over 60 minute minutes, with a linear gradient from 5-35% buffer B (2% H₂O, 98% acetonitrile, 0.1% formic acid). Mass spectra were acquired in data-dependent mode. High-resolution MS scans were acquired in the Orbitrap (60,000 FWHM, target value 10⁶), to monitor peptide ions in the mass range 350-1650 *m/z*, and collision-induced dissociation MS/MS scans were then acquired in the ion trap (minimum signal threshold 150, target value 10⁴) for the five precursor ions with the most intense signals.

MS data analysis and quantification

The raw data were analyzed with MaxQuant (version 1.3.0.5), as previously described (Cox, J. and Mann, M. 2008), with the Andromeda search engine used against the UniProt protein database for *Mus musculus* concatenated with the sequences of common contaminants. A reverse decoy database approach was used to filter protein identifications to obtain a false discovery rate ≤1%.

References:

Universal sample preparation method for proteome analysis.

Nat Methods. 2009 May;6(5):359-62.

Wiśniewski JR, Zougman A, Nagaraj N, Mann M

MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification.

Nat Biotechnol. 2008 Dec;26(12):1367-72.

Cox J, Mann M.

***In situ* proximity ligation assays (PLA) and microscopy**

Cells were fixed by incubation for 20 minutes at room temperature in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and PLA was performed in accordance with the instructions provided by the kit manufacturer (DuoLink, Sigma). The primary antibodies used were incubated in 0.5% Tween, 3% BSA in 1xPBS for 1.5 hours at 37°C (dilutions described in the Supplementary Table). At the end of the PLA protocol, actin was labeled with phalloidin-Alexa 488 (Thermo Fisher Scientific). For the analysis of PLA interaction points, cells were scanned with a laser scanning confocal microscope (Leica, SP5 from the PICPEN imaging platform of the *Centre de Psychiatrie et Neuroscience*) at 63× magnification, zoom 3.43, to obtain an optimal pixel size, and 0.25 µm z-stacks. PLA interaction number was determined with Volocity software on 3D-reconstructions on 70 µm-long dendritic segments and normalized by actin volume. We analyzed one 70 µm dendritic segment per neuron.

When PLA was associated with PSD-95 or Gephyrin immunofluorescence analysis, the sample was prepermeabilized by incubation for 30 minutes in 0.1% Tween in 1xPBS before the PLA protocol. Immunofluorescence analysis was performed directly after the last wash of the PLA protocol. The primary and secondary antibodies used are described in the Supplementary Table. Cells were scanned as described for the PLA assay. Pearson's correlation coefficient was determined with Volocity software, on one dendritic segment per neuron.

BrdU administration

For proliferation studies, mice (WT $n=4$, hBIN1 $n=3$) received one intraperitoneal injection of BrdU (50 mg/kg in 0.9% NaCl, 1.75% 0.4 N NaOH; Sigma). They were killed four hours later.

Tissue preparation and sectioning

Mice were deeply anesthetized with a mixture of ketamine and xylazine (10 µl/g body weight) and perfused transcardially with paraformaldehyde.

For BrdU assays, the perfusion solution was 4% paraformaldehyde. Brains were dissected and fixed overnight in the same perfusion solution at 4°C. They were then incubated for 24 h in a 30% sucrose solution and frozen in chilled 2-methylbutane (-30°C). Coronal serial sections (40 µm thick) were cut with a cryotome and kept at 4°C in 0.01% sodium azide in 1xPBS until the experiment.

For Dil assays, we used 2% paraformaldehyde for perfusion. Brains were dissected out and fixed by incubation for 1 h at 4°C in the same perfusion solution. Coronal sections (70 µm thick) were cut with a vibratome and kept at 4°C in 0.01% sodium azide in 1xPBS until the experiment.

Immunohistochemistry

Brain sections were rinsed three times in 1xPBS and permeabilized by incubation with 0.2% Triton in 1xPBS for 30 minutes at room temperature. DNA was denatured by incubating the brain sections with 2 N HCl in 1xPBS for 30 minutes at 37°C and the sections were then incubated overnight, at 4°C, with rat anti-BrdU antibody (see the Supplementary table). The sections were then incubated with biotinylated anti-rat secondary antibody for 2 h at room temperature and then with avidin-biotin-peroxidase complex (ABC Elite Kit, Vector Laboratories) for 30 minutes. Finally, peroxidase activity was detected by incubation with 3,3'-diaminobenzidine-tetrahydrochloride as the chromogen, with H₂O₂ (Kit SK-4100, Vector Laboratories). Sections were then mounted in Dako mounting medium.

BrdU⁺ nuclei were quantified under a microscope (Zeiss Axioplan 2, PICPEN imaging platform of the *Centre de Psychiatrie et Neuroscience*), at 10x magnification. All BrdU nuclei in the DG of the hippocampus were counted on sections 120 µm apart, from bregma -1.34 mm to -3.28 mm.

Dil assays

Dil crystals were spread over the brain sections with the Helios Gene Gun System (Biorad). Sections were incubated for 3 h with Dil and fixed by incubation in 4% paraformaldehyde for 30 minutes at room temperature. The sections were washed three times in 1xPBS and mounted in Mowiol. Images were acquired with a confocal microscope (Leica, SP5 from the PICPEN imaging platform of the *Centre de Psychiatrie et Neuroscience*) at 40x magnification, zoom 4, z-stack 0.21 µm. Spines were analyzed with Neurolucida software on 3D reconstructions. The density of each type of spine (mushroom, stubby, filapodia) was determined for one dendrite per neuron.

Laser microdissection and microarray assay

Snap-frozen brains from seven-week-old male mice were cut into 40-µm sagittal slices, from lateral 3.00 to lateral 2.52 mm, with a cryostat (Cryostat HM550 MM, Thermo Fisher Scientific). The slices were stained with hematoxylin and eosin and dehydrated by incubation in 50%, 70% and 100 % ethanol solutions. The dorsal and ventral structures (CA1/2, CA3, dentate gyrus) of the hippocampus were microdissected with PalmRoboPro software and the PALM[®] Microbeam (Carl Zeiss MicroImaging GmbH) Laser microdissector. Tissues were collected in 30 µl RNA extraction buffer (Arcturus Picopure RNA isolation kit, Applied Biosystems) and RNA was extracted according to the kit manufacturer's instructions. Microarray assays were performed by IGBMC, *Plateforme Biopuces et Séquençage*, Strasbourg, France, with Affymetrix technology and GeneChip[®] Mouse Gene 2.0. The FCROS

(fold change rank ordering statistics) method was used for the analysis, as previously described (Dembélé D. and Kastner P., BMC Bioinformatics 2014). Expression levels were considered to be significantly different between wt and transgenic mice for $p < 0.02$.

RT-qPCR

Reverse transcription (RT) was carried out with the Maxima First-Strand Kit (Fermentas). The cDNAs generated were amplified by real-time PCR, with probes (obtained from Eurogentec) labeled at their 5' ends with a fluorogenic reporter dye and at their 3' ends with a quencher dye (TAMRA). The sequences of the primers and probes used are available on request. PCR assays were performed in a final reaction volume of 20 μ l, containing 2 U of *Taq* polymerase (Master Mix, Applied Biosystems), 10 μ M primers and fluorogenic probe. PCR was carried out over 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 minute and 50°C for 1 minute. We used the Opticon2 sequence detection system (MJ Research/Biorad) with Opticon Monitor software for data analysis. For each group, the cDNAs synthesized from total RNA were serially diluted to cover the 0.008–50 ng range for specific mRNAs and the 0.008–2.5 ng range for 18S rRNAs. These serial dilutions were used to construct standard curves for 18S rRNA and for each gene of interest and to calculate the amounts of RNA for 18S rRNA and the genes of interest corresponding to the PCR products generated from individual cDNAs for each experimental group. Each quantitative PCR signal was normalized with respect to 18S.

Synaptosome preparation

Fresh cortices and hippocampi from two- to five-month-old OF1 male mice were dissected and homogenized in 30 ml Buffer H (0.32 M sucrose, 5 mM HEPES, 1 mM EDTA), in a Dounce homogenizer (9 strokes, 800 rpm). The homogenate was centrifuged (7 minutes, 2600 rpm, 4°C). The supernatant, containing the cytosolic fraction and the synaptosomes, was centrifuged again (20 minutes, 5000 rpm, 4°C), to obtain a pellet containing the synaptic vesicles. This pellet was resuspended in 1x Buffer H, loaded on a 5%-10%-23% Percoll gradient (2 ml of suspension per gradient), and centrifuged (11 minutes, 18 000 rpm, 4°C). The synaptosomal fraction, which was located between the 10% and 23% phases, was removed and centrifuged (20 minutes, 4000 rpm, 4°C), and the resulting pellet was resuspended in lysis buffer (50 mM NaCl, 50 mM Tris pH8, 1% NP40, 0.5% sodium deoxycholate, with phosphatase and protease inhibitors).

Coimmunoprecipitation assays

Samples from the synaptosomal protein fraction (0.4 mg protein) were precleared by incubation with 30 μ l of magnetic beads (protein G-coated Dynabeads, Novex) for 45 minutes at 4°C, with shaking. In total, 5 μ g of primary anti-BIN1 99D antibody or mouse IgG were bound to 50 μ l protein G-coupled beads by incubation for 45 minutes at 4°C. Precleared lysates were incubated with the antibody-bead complexes overnight, at 4°C, with shaking. The

supernatants were collected. The beads were washed three times (150 mM NaCl, 1% NP40, 10 mM Tris pH 7.5), and the proteins attached to them were eluted by incubation with 2X SDS polyacrylamide gel electrophoresis sample buffer for 10 minutes at 95°C. These proteins were then analyzed by western blotting.

***Ex vivo* electrophysiology**

Electrophysiological experiments were performed in wt ($n=8$ min.) and BIN1-HET ($n=8$ min.) mice. The mice were decapitated under deep anesthesia. The brain was rapidly removed from the skull and placed in chilled (0-3°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) consisting of 124 mM NaCl, 3.5 mM KCl, 1.5 mM MgSO₄, 2.5 mM CaCl₂, 26.2 mM NaHCO₃, 1.2 mM NaH₂PO₄, 11 mM glucose. Transverse slices (300-400 μm thick) were cut with a vibratome and placed in a holding chamber containing ACSF solution, at 27°C, for at least one hour before recording. Each slice was individually transferred to a submersion-type recording chamber and immersed in ACSF continuously superfused and equilibrated with 95% O₂, 5% CO₂. Recordings of presynaptic fiber volleys (PFV) and field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs), mostly resulting from the activation of AMPA receptors, the construction of input/output (I/O) curves assessing the responsiveness of the AMPA/kainate glutamate receptor (A/K), and the measurement of paired-pulse facilitation (PPF) have been described elsewhere (Potier *et al.*, 2010). Long-term potentiation (LTP) was triggered by theta-burst stimulation, in the form of five trains of four 100 Hz pulses each, separated by 200 ms and delivered at the test intensity (repeated four times with an interburst interval of 10 s). Another stronger type of LTP was produced by three 100 Hz stimulations 20 seconds apart. Long-term depression (LTD) was induced by low-frequency stimulation at 2 Hz (1200 pulses over a period of 10 min).

Experiments were performed on the CA1 area after stimulation of the stratum radiatum, or on the dentate gyrus (DG). For DG experiments, the stimulation and recording electrodes were placed in the middle third of the molecular layer of the DG, 500 μm apart, and bicuculline methiodide (50 μM, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) was added to the perfusion medium throughout LTP recordings.

We evaluated the biophysical properties of the glutamate-dependent and GABA-dependent tonic currents, and the miniature spontaneous activity dependent on these neurotransmitters, on hippocampal slices from BAC-BIN1 mice and their wild-type siblings. Whole-cell patch-clamp recordings were performed on CA1 pyramidal neurons or dentate gyrus granular cells at room temperature, with borosilicate patch pipettes (5 MΩ) filled with 140 mM CsCH₄O₃S, 6 mM CsCl, 2 mM MgCl₂, 10 mM HEPES, 1.1 mM EGTA, 5 mM QX-314, 4 mM ATP (pH 7.3; 290 mosm).

Transmembrane currents were acquired and filtered by an amplifier (AxoPatch 1-D, Axon Instruments), stored on a computer and digitized with WinLTP software (Anderson and Collingridge, 2001) for online and offline analysis.

Miniature spontaneous excitatory postsynaptic currents (mEPSCs) were recorded in the continuous mode at $h_p = -60$ mV, in the presence of TTX (1 μ M) and bicuculline (10 μ M). The glutamate-dependent tonic current was recorded at a holding potential of +40 mV, in the presence of TTX (1 μ M), NBQX (10 μ M), and bicuculline (10 μ M), to isolate the NMDA component of the holding current (hc). After 3-5 minutes recording of a stable control hc, APV (50 μ M) was added to the superfusion medium. This caused the hc to decrease to a new stable value, and the difference between the control hc and the hc in the presence of APV was used to determine the amplitude of the tonic Glu current.

GABA-dependent miniature inhibitory postsynaptic currents (mIPSCs) were recorded at +10 mV in the presence of TTX (1 μ M), NBQX (10 μ M) and APV (50 μ M). In this configuration, the addition of bicuculline (10 μ M) fully abolished the mIPSCs and induced a decrease in hc to a new stable value. The difference between the control hc and the hc in the presence of bicuculline was used to determine the amplitude of the tonic GABA current. We determined mEPSC and mIPSC frequencies and amplitudes with Spike 2 (CED, Cambridge).

References:

Potier B., Billard J-M., Rivière S., Sinet P-M., Denis I., Champeil-Potokar G., Grintal B., Jouvenceau A., Kollen M. and Dutar P. "Reduction of glutamate uptake is associated with extrasynaptic NMDA and metabotropic glutamate receptor activation at the hippocampal CA1 synapse of aged rats"; *Aging Cell*, 9 :722-35, 2010.

Anderson WW, Collingridge GL. The LTP Program: a data acquisition program for on-line analysis of long-term potentiation and other synaptic events. *Journal of Neuroscience Methods*. 2001;108(1):71-83.

Yeast two-hybrid analysis

Yeast two-hybrid screening was performed by Hybrigenics Services, S.A.S., Paris, France (<http://www.hybrigenics-services.com>).

The coding sequence for mouse amphiphysin 2 (aa 1-410; GenBank accession number gi:134053916) was amplified by PCR and inserted into pB27 as a C-terminal fusion to LexA (N-LexA-Amph-C). The construct was checked by sequencing the entire insert and used as a bait for the screening of a random-primed adult mouse brain cDNA library constructed in pP6. pB27 and pP6 are derived from the pBTM116 (Vojtek and Hollenberg, 1995) and pGADGH (Bartel *et al.*, 1993) plasmids, respectively.

We screened 77 million clones (7-fold coverage of the complexity of the library) by a mating approach with the YHGX13 (Y187 *ade2-101::loxP-kanMX-loxP*, *mata α*) and L40 Δ Gal4 (*mata*) yeast strains, as previously described (Fromont-Racine *et al.*, 1997). We obtained 131 His⁺ colonies by selection on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and their 5' and 3' junctions were sequenced. The resulting sequences were used to identify the corresponding interacting proteins in the GenBank database (NCBI), in a fully automated procedure. A confidence score

(predicted biological score) was attributed to each interaction, as previously described (Formstecher *et al.*, 2005).

Further description of the confidence score: The predicted biological score is based on two different levels of analysis. Firstly, a local score takes into account the redundancy and independence of prey fragments, together with the distribution of reading frames and stop codons in overlapping fragments. Secondly, a global score takes into account the interactions detected in all the screens of the same library performed at Hybrigenics. This global score represents the probability of an interaction being nonspecific. For practical use, the scores were divided into four categories, from A (highest confidence) to D (lowest confidence). A fifth category (E) was for the specific identification of interactions involving highly connected prey domains found in several previous screens of libraries for the same organism. Finally, several of these highly connected domains were confirmed to be false-positives and were therefore tagged "F". Predicted biological score has been shown to be positively correlated with biological significance of interactions (Rain *et al.*, 2001; Wojcik *et al.*, 2002).

Supplementary Table

Antibody	Dilution
BIN1 99 D (mouse) Millipore	1/250
CLIP-1 (rabbit) Produced in-house (Curie Institute, Perez F.)	1/200
N-WASP (rabbit) Sigma Atlas Antibodies	1/200
Nufip1 (rabbit) Produced in-house (Bardoni B.)	1/500
Tiam1 (rabbit) Santa Cruz Biotech	1/250

Mouse line generation and validation

The humanized TgBIN1 mouse lines were established at the MCI/ICS (Mouse Clinical Institute - Institut Clinique de la Souris-, Illkirch, France; <http://www-mci.u-strasbg.fr>).

A BAC (RP11-437K23 - RPCI human BAC library 11) originally generated by the BACPAC Resource Center (BPRC) at Children's Hospital Oakland Research Institute in Oakland (California) was purchased. A maxiprep (NucleoBond® BAC 100; Macherey Nagel) of this BAC

was prepared. Careful restriction digestion analysis was performed to verify the integrity of the BAC and the sequence of all the coding exons was confirmed by PCR and Sanger sequencing. The nomenclature of all the exons/introns was based on the work of Prokic (Prokic *et al.*, 2014). The BAC preparation was microinjected into the pronuclei of fertilized C57Bl/6N oocytes. Eleven founders were obtained and crossed for germline transmission.

The number of BAC copies in each of the sublines established was estimated by qPCR (LightCycler® 480 SYBR Green I Master) on DNA from the ears of two transgenic animals, with comparison to one wt reference: the number of murine DNA copies was determined by sequence amplification targeting the intron5/exon6 junction (primer sequences Fw1: gcccactgatctctctc / Rv1: ggcactgtcatagtcacca). The number of BAC human DNA copies was determined by amplifying the exon 2 region (primer sequences Fw2: tccccttctctcttgcttc / Rv2: ctgctcatccttgggtctcatc) and the final region of intron 19 (primer sequences Fw3: cttcccagcaggttggagtgg / Rv3: accaggtcgacagggatg). We then assessed mRNA levels by RT-qPCR: reverse transcription was performed on 1 µg of RNA with the QuantiTect® Reverse Transcriptase from Qiagen. We obtained cDNA from mRNA from the liver, brain and quadriceps extracts of one wt and three transgenic mice. Two sets of primers were designed, targeting exon 20 to distinguish between the murine cDNA (Fw4: atttacagagcgggtgcag / Rv4: ctttggggaaaggttcttc) and its human counterpart (Fw5: cactgagaggtccatgac / Rv5: cacacattttcgggaggag). We then designed two other primer pairs for separate amplification of the neuronal isoforms (1-7) (Fw6: ggacacgtttgtccctgag / Rv6: ccttcacagggctcgtca, hybridizing to exon 13) and the muscle-specific isoform (8) (Fw7: acgggagcaacaccttca / Rv7: gccgcgaaaacagtttactt, hybridizing to exon 11).

Overproduction of the protein was confirmed by western blotting. Hippocampus and muscle samples were collected from three mice of each genotype (wt and Tg(*BIN1*)) at three months of age, and four samples were collected from each genotype at the age of 15 months. Tissues were crushed with the Precellys system (Lysing Kit CK14) in RIPA lysis buffer (Santa Cruz sc-24948). Protein concentration was determined by the Bradford method, with the Pierce BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific #23225). We subjected hippocampus and muscle extracts (10 µg total protein) to SDS-PAGE in 10% acrylamide gels. The protein bands were transferred to a nitrocellulose membrane by electroblotting (at 120 V) for 1.5 h, on ice. Nonspecific binding sites were blocked by incubation of the membrane with 5% skim milk powder in Tween-Tris in PBS for 1 h at room temperature. Immunoblotting was carried out with a Bin1 pan-isoform primary antibody (mouse anti-Bin1 1/5000, Sigma B9428) followed by a horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (goat anti-mouse Dako P0448). Immunoreactions were visualized by enhanced chemiluminescence (Pierce ECL western blotting substrate – Thermo Fisher Scientific). Epifluorescence was captured with an Amersham Imager 600. Bands were detected at 85 and 90 kDa in the brain, and at 55 and 64 kDa in muscle. The intensity of these bands was quantified with ImageJ.

Ethical statement and mouse breeding

Mice were handled with the approval of the local ethics committee and in accordance with European Council Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals ETS 123. Dr Yann Herault was granted accreditation 67-369 to perform the experiments described here. All animals were treated in accordance with the animal welfare policies of the French Ministry of Agriculture. This project was authorized by the French Ministry of Agriculture (law 87 848) under accreditation 67–369. The local ethics committee approved the experiments described, through accreditation number 2014-056. In all these experiments, the mice were provided with free access to water and food (D04 chow diet, Safe, Augy, France). The light cycle was controlled and set at 12 h light and 12 h dark (lights on at 7 am). The temperature was maintained at 23 ± 1 °C.

Behavioral studies were performed on animals aged between three and 15 months. Mice were transferred from the animal house to the phenotyping area at the age of eight to 10 weeks. On testing days, animals were transferred to the antechamber of the experimental room 30 minutes before the start of the experiment. All experiments were performed between 9.00 am and 4.00 pm. Mice were allowed to rest for at least three days between consecutive tests. For the behavioral studies, we crossed transgenic hemizygotes (Tg(*BIN1*)/0) with wild-type C57BL/6J animals to generate three successive cohorts of males that were studied at different ages. Cohort 1 contained nine Tg(*BIN1*)/0 mice and 10 wildtype (wt) littermates, and was studied at 3, 6, 9, 12 and 15 months. For confirmation of the phenotypes observed in this cohort, and to avoid the effects of cumulative tests, we also established two other cohorts: one was tested at three and six months (cohort 2), and the other (cohort 3) was tested at nine and 12 months. The second cohort consisted of 13 Tg(*BIN1*)/0 mice and 15 wt littermates and the third cohort consisted of 11 Tg(*BIN1*)/0 mice and 12 wt littermates. Tests were run in the following order: open field, novel object recognition, fear conditioning, over a period of three weeks, as described in the supplementary information.

Supp. Information

Recognition memory was assessed at the ages of 15, 26, 40 and 56 weeks for cohort 1, at 13 and 24 weeks for cohort 2 and at 39 and 57 weeks for cohort 3. For the pattern separation protocol based on contextual fear conditioning, only cohort 1 (at 12 months – 69 weeks) and cohort 3 (at 9 months – 37 weeks) were tested. Finally, the Morris water maze (MWM) test was carried out on mice from cohort 1 at the age of 42 weeks. Animals were allowed to rest for one week between tests.

Behavioral procedures

Novel object recognition paradigm

We used the novel object recognition task to assess recognition memory. On day 1 (D1), a habituation session was carried out in a white round box (55 cm in diameter), in which mouse activity was recorded with a video tracking system (Ethovision, Noldus, France) over a period

of 30 minutes. After each mouse trial, the arena was thoroughly cleaned to minimize olfactory cues. On day 2 (D2), animals were presented with a pair of identical objects (marble or dice) until they had explored the objects for more than 3 seconds during a period of up to 10 minutes, beginning with the first sniffing behavior. Exploration was defined as any deliberate investigation of an object located at a distance of about 2 cm, or touched with the nose. Mice exploring the novel objects for less than three seconds during the 10-minute period were excluded. In the second trial (test phase, 1 h later), one of the familiar objects was replaced with a new one, and the animals were left in the arena for 10 minutes. The same exclusion threshold was applied after this retention phase. We controlled odor cues, by cleaning the arena and the objects thoroughly with 50% ethanol, drying them and ventilating the set-up for a few minutes between mice. Memory was operationally defined as the time spent exploring each object and the discrimination index (DI) was defined as the time spent investigating the novel object relative to that spent exploring the familiar object ($DI = (\text{novel object exploration time} / \text{total exploration time}) - (\text{familiar object exploration time} / \text{total exploration time}) \times 100$).

Morris water maze assessment of spatial memory

For this task, we used the one-position learning protocol adapted from that described by Morris (Morris, 1984). The water maze was a circular pool (150 cm in diameter, 60 cm high) filled to a depth of 40 cm with water maintained at 20°C–22°C and rendered opaque by coating with a white aqueous emulsion (Acusol OP 301 opacifier). It was split into four virtual quadrants: South-East (SE), North-West (NW), North-East (NE), South-West (SW). The escape platform (PTF), made of rough plastic, was submerged 1 cm below the surface of the water. We used this experiment to study reference memory through a spatial search strategy that involved finding the hidden platform. The spatial memory session consisted of a six-day (D1 to D6) learning phase, with four 90-second trials per day. Each trial started with the mice placed in the water facing the inner wall of the pool and ended when they climbed onto the platform located in the SE quadrant or after a maximum searching time of 90 seconds. The starting position was changed pseudorandomly between trials. Mice were allowed to dry under heating lamp for 10 to 15 minutes between trials. On the seventh day, the mice underwent the 60-second probe test, in which the platform had been removed. On day 9 (C1), we performed a cued version test, in which each mouse underwent four 60-second trials in which the PTF, located in the western part of the maze, was labeled with a flag. This special test made it possible to distinguish between spatial learning defects and ocular defects. The time take to find the platform, the distance traveled in each quadrant (NW, NE, SW, SE) and mean speed were recorded, to quantify the time spent in the target quadrant. The swimming path was recorded and analyzed with Ethovision software from Noldus®. In total, 10 wt and 9 Tg mice underwent this test, but two wt mice were excluded because they didn't swim in all the trials on D2.

Contextual fear discrimination task

The procedure was adapted from a previously described protocol (McHugh *et al.*, 2007). We used polymodal operant conditioning chambers (Coulbourn Instruments, Allentown, PA) for this experiment. We created two different environmental contexts: **Context A**, in chamber A, was defined as a room lit with overhead lighting at 50 lux and containing two conditioning chambers. The 18.5 × 18 × 21.5 cm chamber had a Plexiglas wall at the front and the back and side walls were made of aluminum. The chamber floor consisted of a grid composed of 16 stainless steel rods connected via a cable harness to a shock generator. The chambers were cleaned with 5% sodium hydroxide between mice and a pan coated with 0.25% benzaldehyde in ethanol was placed beneath the chambers during the experiment to provide an olfactory cue. **Context B**, in chamber B, included crucial modifications: the location of the overhead light was changed, we masked the wall with black Plexiglas squares and we changed the ceiling motif. As in context A, the floor of each chamber consisted of 16 stainless steel rods wired to a shock generator and scrambler. This context was cleaned and scented with a 1% acetic acid solution. The room was lit with a 30-W red overhead light. Each day, the animals were transported, in their home tubs, to a room adjacent to the experimental room. They were left undisturbed for at least 20 minutes between experiments..

On days 1-3, the mice were carried to the context A conditioning room and placed in the conditioning chambers. After 192 s, they received a single foot-shock (2 s; 0.65 mA), after which they were removed from the chambers for 1 minute. On the next two days (days 4 and 5), the mice were placed into the context A and context B conditioning chambers in separate tests in which the order of the contexts was balanced over the whole cohort. Each test involved eight minutes of exposure to the chamber without the delivery of a foot-shock. On days 6 through 12, mice were exposed to both context A and context B conditioning chambers daily. The order of exposure on each day followed a BAABABBABAAB design. Across the entire discrimination phase, all animals received a single foot-shock during each exposure to context A, with no foot-shock during exposure to context B. The dependent variable was freezing behavior; the general activity of the animals was recorded via an infrared cell on the ceiling of the chambers, directly on a PC computer with Graphic State software (Coulbourn). Each mouse was awarded a score indicating a frozen or non-frozen state of movement, every 2 seconds. These scores were then converted into a percentage of observations during which the mice were not moving (freezing behavior). Over the 12 days, we evaluated the percentage of time for which the mice were not moving only for the first three minutes after their introduction into the chamber (192 s for conditioning days).

References

McHugh TJ, Jones MW, Quinn JJ, Balthasar N, Coppari R, Elmquist JK, Lowell BB, Fanselow MS, Wilson MA, Tonegawa S (2007) Dentate gyrus NMDA receptors mediate rapid pattern separation in the hippocampal network. *Science* 317:94-99.

Morris R (1984) Developments of a water-maze procedure for studying spatial-learning in the rat. *Journal of Neuroscience Methods* 11:47-60.

Prokic I, Cowling BS, Laporte J (2014) Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *Journal of Molecular Medicine-Jmm* 92:453-463.

Discussion

Notre étude montre que la surexpression de BIN1 contribue au développement d'une séquence de phénotypes liés à la cognition. Cette séquence commence, à 3 mois, par une atteinte fonctionnelle (LTP) et morphologique de la synapse de la voie perforante cortex entorhinal - Gyrus Denté et se poursuit par une atteinte comportementale avec une altération de la mémoire de reconnaissance à 6 mois et une incapacité à séparer finement deux contextes à 15 mois. La mémoire spatiale à long terme (piscine de Morris) reste intacte à 9 et 12 mois. La mémoire de reconnaissance implique le cortex périrhinal et le cortex entorhinal latéral (LEC) (Brown and Aggleton, 2001), tandis que la mémoire spatiale implique le cortex postrhinal et le cortex entorhinal médian (MEC) (Knierim, 2015). La souris hBIN1 présente une altération fonctionnelle spécifique de la synapse Gyrus Denté – Cortex entorhinal ainsi qu'une altération de la mémoire de reconnaissance, ce qui pointe une atteinte de la voie cortex périrhinal – LEC - Gyrus Denté. De manière cohérente avec ces résultats et avec la séquence des phénotypes développés par notre modèle, l'utilisation combinée de méthodes d'imagerie fonctionnelle chez des individus au stade pré-clinique de la MA et de modèles souris a permis de démontrer que le LEC était impacté à ce stade de la pathologie, au contraire du MEC (Khan et al., 2014). Ensemble, ces résultats montrent que la souris hBIN1 mime des altérations caractéristiques du stade pré-symptomatique de la MA. Ces observations sont également cohérentes avec les travaux de Biffi et al et de Zhang et al montrant l'association d'un SNP BIN1 avec des altérations de l'épaisseur du cortex entorhinal et de l'hippocampe ainsi qu'avec des altérations cognitives (Biffi et al., 2010; Zhang et al., 2015). Il est intéressant de noter que l'implication de BIN1 dans des phénotypes morphologiques liés à la cognition (Biffi et al., 2010) ont été mis en évidence avant que les études de GWAS n'identifient BIN1 dans le « Top 10 » des gènes associés à la MAS (Lambert et al., 2013).

Il a été rapporté qu'au stade pré-symptomatique de la maladie, des espèces solubles d'A β pourraient être responsables des légères atteintes cognitives observées chez les patients (Dodart et al., 2002; Selkoe, 2002). Il serait ainsi intéressant d'étudier la pathologie A β chez la souris hBIN1.

Nous avons d'autre part démontré la présence de BIN1 dans un interactome post-synaptique impliquant les protéines Tiam1, Kalrn, CLIP-1 et N-WASP. La quantification de Rac1-GTP a montré une sur-activation de cette voie dans l'hippocampe des souris hBIN1. Les protéines Tiam1 et Kalrn ont été décrites pour leur rôle dans la régulation des récepteurs glutamatergiques à la membrane de l'épine (Kiraly et al., 2011). De plus, un des rôles les plus décrits de BIN1 est son implication dans les processus d'endocytose clathrine-dépendants (Di Paolo et al., 2002). Nous avons ainsi testé la possibilité que les atteintes synaptiques observées dans le modèle hBIN1 soient dues à une baisse de la densité des récepteurs glutamatergiques à l'épine. La quantification des sous-unités GluA1, GluA2, et NR2B à la membrane de neurones hippocampaux issus de souris sauvages et de souris transgéniques a

cependant montré une densité équivalente de ces sous-unités entre les deux génotypes, au niveau synaptique et extrasynaptique (Fig. Supplémentaire 1). A l'inverse, les anomalies électrophysiologiques de plasticité synaptique localisées à la synapse voie perforante-Gyrus Denté et les anomalies morphologiques des épines dendritiques à ces mêmes synapses indiquent une anomalie localisée.

Les autres modèles transgéniques de la MAS sont les modèles basés sur le gène APOE, qui est le locus le plus significativement associé à la maladie. Parmi ces modèles, les plus proches du notre sont les souris humanisées KI hAPOE ϵ 4 et les souris exprimant le gène humain APOE ϵ 4 dans les neurones (NSE-hAPOE ϵ 4). Les KI hAPOE ϵ 4 présentent une baisse de la survie des nouveaux neurones du gyrus denté due à une perte des neurones GABAergiques (Li et al., 2009) qui corrèle avec des déficits de mémoire et d'apprentissage (Andrews-Zwilling et al., 2010). Les souris hBIN1 présentent une augmentation de la prolifération cellulaire du gyrus denté, mais la survie n'a pas été évaluée. Les courants GABAergiques ont été testé à 19 mois et ne montrent aucune altération. Les souris NSE-APOE présentent, à 6 mois, un déficit de mémoire spatiale (Morris Water Maze) uniquement chez les femelles. Ce déficit n'apparaît chez le mâle NSE-hAPOE ϵ 4 que s'il est croisé avec une souris hAPP. Ces souris présenteraient d'autre part une augmentation de la phosphorylation de la protéine TAU (Brecht et al., 2004). Toutes les expériences effectuées sur le modèles hBIN1 ont été menées chez les mâles. Les données épidémiologiques suggèrent que les femmes présentent un risque plus important de développer la maladie d'Alzheimer (Tableau 2). Il serait éventuellement intéressant d'évaluer le phénotype des femelles hBIN1. Le développement d'une TAUopathie n'a pas été testé chez les souris hBIN1. Une interaction entre les protéines BIN1 et TAU a récemment été mise en évidence (Chapuis et al., 2013). Cette interaction co-localiserait partiellement avec le cytosquelette d'actine des neurones sans être mise en évidence au niveau des dégénérescences neurofibrillaires (Sottejeau et al., 2015). Au total, les résultats obtenus chez les souris APOE et hBIN1 suggèrent que les facteurs de risque génétiques de la Maladie d'Alzheimer Sporadique impactent de multiples voies de signalisation qui convergent vers une atteinte de l'hippocampe et de ses connexions cérébrales. Le stade pré-symptomatique est le stade auquel un véritable traitement est possible : c'est en effet un stade qui précède la neurodégénération et l'atrophie cérébrale responsable des symptômes cognitifs (Sperling et al., 2011). L'identification de la dérégulation de la voie BIN1/Tiam1/Rac1/F-actin associée à un phénotype pré-symptomatique chez les hBIN1 pourrait ainsi permettre le développement de stratégies thérapeutiques pour la Maladie d'Alzheimer Sporadique.

PARTIE II : L'interaction BIN1-Munc18-1, implication dans la maladie d'Alzheimer

Introduction

Un des marqueurs histopathologiques caractéristiques de la MA est une importante perte synaptique observée dans le cerveau des patients. Cette atteinte est mise en évidence dès les stades précoces de la maladie, avant la perte neuronale et l'atrophie, principalement au niveau des synapses cholinergiques et glutamatergiques (Small et al., 2001) et serait à l'origine de la légère atteinte clinique décelée lors du stade de MCI.

A la terminaison axonale, les protéines SNAP-25, syntaxine-1 et synaptobrevine du complexe SNARE (Soluble NSF-Attachement protein REceptors) travaillent de concert avec les protéines cytoplasmiques SM (Sec1/Munc18-like) pour assurer l'exocytose des neurotransmetteurs (Hata et al., 1993; Söllner et al., 1993). De plus en plus d'études suggèrent que cet ensemble protéique SNARE/SM serait également impliqué dans l'exocytose des récepteurs glutamatergiques au niveau de l'épine dendritique (Kennedy et al., 2010; Lledo et al., 1998; Lu et al., 2001). En 2013, les équipes de Malenka et de Südhof montrent que l'exocytose des récepteurs AMPA lors du processus de LTP dépend de l'association d'un complexe SNARE formé des protéines SNAP-47, syntaxine-3 et synaptobrevine 2 avec une protéine Munc18-1 like (Jurado et al., 2013) (Fig.1.B).

Afin de connaître le niveau d'expression de ces gènes exprimés à la fois à la pré- et à la post-synapse, nous avons analysé des données post-mortem de transcriptome (ARNm) de patients souffrant de MA pour deux jeux de données différents. Ces analyses montrent une perte significative des transcrits des gènes codant pour Munc18-1 (STXBP1), syntaxine-1A, synaptobrevine 2 (VAMP2) et SNAP-25 dans le cortex (Fig.1.C) et dans le cortex préfrontal (Fig.1.D) des patients par rapport aux contrôles. Nous avons ensuite cherché à caractériser les interactions des produits de ces gènes d'intérêt avec les produits des gènes des études GWAS Alzheimer. Deux cribles de la protéine Munc18-1 ont mis en évidence une interaction avec BIN1, connue pour son implication dans les processus d'endocytose clathrine-dépendants aux abords de la zone active (Di Paolo et al., 2002; Ramjaun et al., 1997). Une telle relation entre les machineries d'exo- et d'endocytose a déjà été mise en évidence. En 1999, l'équipe de Südhof montre une interaction entre les protéines SNAP-25 et Intersectin (Okamoto et al., 1999). Plus récemment, une autre équipe a montré que les protéines d'exocytose SNAP-25 et Synaptobrevin aurait également un rôle dans l'endocytose des neurones hippocampiques (Zhang et al., 2013).

Le but de cette étude a été la validation de l'interaction entre Munc18-1, protéine de l'exocytose, et BIN1, protéine de l'endocytose, dans un système neuronal, et la compréhension de son rôle au niveau physiologique et pathologique.

Résultats

Validation de l'interaction dans un système neuronal (Fig.2)

Afin de vérifier l'existence de l'interaction dans un système neuronal, des expériences de Proximity Ligation Assay (PLA) ont été menées sur des neurones hippocampaux de souris sauvages, à 21 jours in vitro. La PLA a été associée à un marquage de l'actine filamentaire (Phalloïdine couplée à l'Alexa 488) permettant de visualiser l'ensemble du neurone et d'y localiser l'interaction (Fig.2.A). Les acquisitions ont été effectuées au microscope à épifluorescence avec un objectif d'agrandissement 40X, permettant d'imager la totalité d'un neurone isolé. Les compartiments somatique et dendritique ont été distingués par le traçage de ROI (Region of Interest) basé sur le signal de l'actine. La quantification valide l'existence de l'interaction dans les deux compartiments en comparaison à un contrôle négatif physiologique PICALM (protéine synaptique) - SMARCA2 (protéine nucléaire). Ces résultats montrent d'autre part une présence équivalente de l'interaction dans le soma et les dendrites (Fig.2.B).

Validation de l'interaction au niveau synaptique

Nous avons par la suite cherché à savoir si l'interaction quantifiée dans les dendrites se situait ou non au niveau des synapses. Dans un premier temps, le co-marquage Actine-PLA a été imagé au microscope confocale avec un objectif d'agrandissement 63X et un zoom de 3,43 permettant d'obtenir une qualité optimale d'image (taille de pixel proche de 70 nm). Cette expérience a qualitativement confirmé la présence de l'interaction BIN1-Munc18-1 au niveau des synapses : on observe en effet des points de PLA co-localisant partiellement avec les épines dendritiques (Fig.2.C). Cette localisation synaptique a également été testée via des expériences de co-immunoprécipitation. A partir de synaptosomes de souris sauvages, la protéine BIN1 endogène a été immunoprécipitée et la présence de Munc18-1 dans l'immunoprécipitat a été recherchée par Western Blot. Le résultat de cette expérience, reproduit 3 fois, confirme l'existence de l'interaction dans la fraction synaptosomale (Fig.2.D).

Caractérisation de BIN1-Munc18-1

1. Localisation subcellulaire (Fig.3)

La co-localisation partielle des points de PLA avec les épines dendritiques laisse penser à une localisation post-synaptique de l'interaction. Afin de tester cette hypothèse, nous avons associé la PLA à un marqueur pré-synaptique SNAP-25 ou à un marqueur post-synaptique PSD-95. Malgré un bon fonctionnement de l'anti-SNAP-25 en immunofluorescence, l'immunomarquage n'a donné aucun signal en association avec la PLA BIN1-Munc18-1. Le co-marquage PSD-95 – BIN1-Munc18-1 a quant à lui fonctionné (Fig.3.A). Les acquisitions ont été effectuées au microscope confocale avec les mêmes réglages que pour le co-marquage PLA-Phalloïdine. A l'aide du logiciel d'imagerie Volocity, la corrélation des deux marquages a été évaluée via l'utilisation du coefficient de Pearson sur des

portions de dendrite de 10 neurones différents. Les résultats ont été comparés à ceux des interactions Syntaxine1-Munc18-1 et DLG1-DLGAP1, qui sont des contrôles pré et post-synaptiques respectivement. On observe une corrélation forte de PSD-95 avec DLG1-DLGAP1 (Pearson : 0,5176), une absence de corrélation avec Munc18-1-Syntaxine 1 (Pearson : 0,1264), et une corrélation limitée avec BIN1-Munc18-1 (Pearson : 0,3586) (Fig.3.C). Plus de la moitié des points de la PLA BIN1-Munc18-1 (52,44 %) ne co-localisent pas avec le marqueur PSD-95, une protéine de la densité post-synaptique excitatrice. Cette donnée est cohérente avec une localisation pré et post-synaptique de BIN1. Nous avons également testé la co-localisation de l'interaction avec un marqueur de l'élément post-synaptique des synapses inhibitrices : la géphyrine (Fig.2.B). Le coefficient de Pearson montre une absence de corrélation entre les deux marquages (Pearson : 0,058) (Fig.3.D).

2. Caractéristiques moléculaires de l'interaction

Munc18-1 est une protéine qui présente plusieurs sites de phosphorylation, dont les plus décrits sont en Sérine 313 (Craig et al., 2003), en Sérine 306 (Barclay et al., 2003; Wierda et al., 2007) et en Thréonine 574 (Lilja et al., 2004; Liu et al., 2004). La phosphorylation de Munc18-1 sur un de ces sites est connue pour modifier ses interactions avec ses partenaires protéiques. Par exemple, la phosphorylation de Munc18-1 par la protéine kinase C inhibe son interaction avec un de ses partenaires majeurs, Syntaxine-1 (Fujita et al., 1996).

Nous nous sommes demandés si, de la même manière, l'interaction BIN1-Munc18-1 pourrait dépendre de la phosphorylation de Munc18-1. Afin de répondre à cette question, des expérimentations dans la levure sont actuellement menées par Hybrigenics Services, entreprise co-encadrante de la thèse. Munc18-1 a été mutée sur les trois sites Ser306, Ser313 et Thr574. L'interaction de ce mutant est testée avec BIN1 et, en parallèle, avec syntaxine-1 comme contrôle d'interaction phosphorylation-dépendante.

Rôle potentiel dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer

1. Etude de BIN1-Munc18-1 dans le modèle hBIN1 (Fig.4)

La PLA a par la suite été utilisée afin de quantifier l'interaction dans des neurones primaires hippocampaux issus de souris transgéniques hBIN1 et de souris sauvages. L'expérience a été reproduite sur trois lamelles issues de trois embryons transgéniques et trois lamelles issues de trois embryons sauvages de la même portée. Les dendrites ont été imagées par microscopie confocale dans leur volume avec un pas de 0,25 μm , permettant la quantification de tous les points de PLA dans le volume d'actine. L'analyse, menée sur 10 neurones par embryon, montre que la quantité d'interaction BIN1-Munc18-1 est significativement augmentée dans les neurones hBIN1 par rapport aux neurones sauvages (wt: 0,62 +/- 0,02, hBIN1: 0,79 +/- 0,03 interactions par μm^3 d'actine) (Fig.4.B1). Pour évaluer l'impact de cette modification sur l'interactome de munc18-1, l'interaction de Munc18-1 avec son

partenaire syntaxine 1 a également été testée. Les résultats montrent une augmentation significative de cette interaction dans les neurones hBIN1 par rapport aux neurones issus de souris sauvages (wt: 0,21 +/- 0,02 ; hBIN1 : 0,28 +/- 0,01)(Fig.4.B2).

2. Rôle de l'interaction dans la physiopathologie de la maladie d'Alzheimer (Fig.5)

La nouvelle interaction de BIN1 avec Munc18-1 relie BIN1 à d'autres protéines associées à la MA : APBA2/Mint2/X11-like et RNF219 (Fig.5.A). APBA2, une protéine enrichie dans les neurones excitateurs, interagit avec Munc18-1 dans le cadre de l'arrimage et de la fusion des vésicules synaptiques (Biederer and Südhof, 2000). Cette protéine est également connue pour interagir avec l'APP et la stabiliserait en induisant sa phosphorylation par la Jun-N-Terminal Kinase (JNK) (Taru and Suzuki, 2004). Son expression régulerait la production du peptide A β dans les modèles murins de la MA (Ho et al., 2008; Lee et al., 2004). Il a de plus été montré que les souris vieillissantes déficientes en APBA2 développaient une plus grande quantité de dépôts amyloïdes que les souris sauvages du même âge (Sano et al., 2006). RNF219 et APBA2 ont récemment été associées à la MA sporadique par l'équipe d'Asa Abeliovich via une étude de réseaux basée sur l'expression différentielle des transcrits chez les patients (Rhinn et al., 2013). RNF219 serait également impliquée dans la régulation du peptide amyloïde et interagirait génétiquement avec APOE.

Un cribble de la protéine RNF219 a révélé son interaction avec la protéine Munc18-1 (Hybrigenics Services, résultats non publiés). Dans un système simple de lignée neuronale murine N18, je me suis tout d'abord attachée à valider l'interactome Munc18-1 - APBA2 / Munc18-1 - RNF219 en utilisant la technologie PLA (Fig. 5.B1). Cette méthode confirme l'interaction entre Munc18-1 et APBA2 et montre pour la première fois une interaction directe entre les protéines Munc18-1 et RNF219 dans un système neuronal. La quantification des points de PLA montre qu'il s'agit d'une interaction substantielle (Munc18-1-APBA2 : 0,051 points/ μm^2 d'actine ; Munc18-1-RNF219 : 0,016 points/ μm^2) mais significative dans les N18 (p-value <0,001) (Fig. 5.B2). L'interaction avec RNF219 a dans un second temps été validée dans un système plus complexe de neurones primaires hippocampaux murins âgés de 21 jours in vitro (Fig. 5.C1-2). La quantification montre une présence de l'interaction dans les compartiments somatique et dendritique, avec un enrichissement significativement plus important dans le soma (dendrites : 0,015 points/ μm^2 d'actine ; soma : 0,062 points/ μm^2) (Fig. 5.C2).

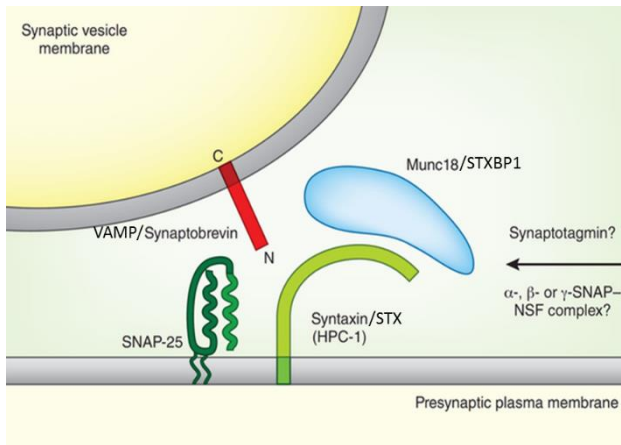
Discussion

Les résultats de cette partie du travail de thèse montrent l'existence d'une interaction entre les protéines BIN1 et Munc18-1 dans les neurones et tendent à montrer qu'à la synapse, cette interaction se localise dans l'élément post-synaptique. Pour appuyer cette hypothèse, nos résultats se basent sur des images de microscopie confocale. Cependant, la résolution de ce système d'imagerie n'est que

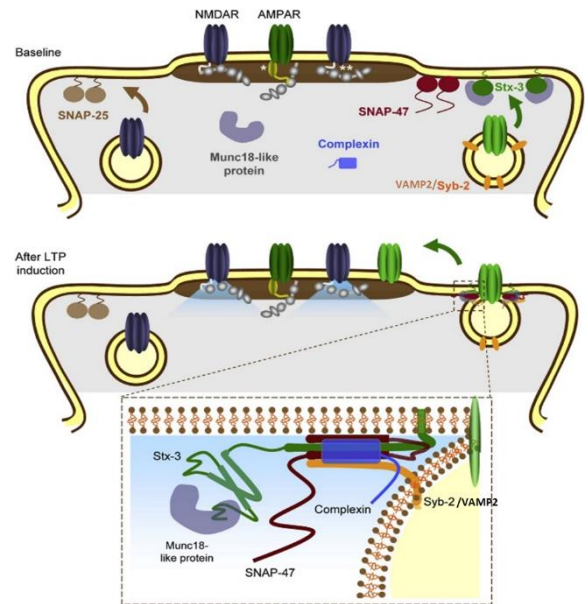
d'environ 200 nm en y et 400 nm en z. La fente synaptique mesurant environ 20 nm, il est en vérité impossible, avec ces résultats, d'affirmer que l'interaction se localise à l'épave. L'utilisation de l'imagerie de haute résolution (dSTORM) dans la première partie du travail de thèse a montré que la protéine BIN1 synaptique se retrouvait de manière quasi-équivalente dans les compartiments pré (53,4%) et post-synaptique (46,6%). De même, Munc18-1 a été décrite dans les deux compartiments (Hata et al., 1993; Jurado et al., 2013). Leur interaction pourrait donc exister dans les deux compartiments. Afin de les discriminer, il faudrait combiner la PLA à une imagerie de haute résolution telle que le dSTORM. Si la localisation post-synaptique de l'interaction reste à vérifier, un ensemble de résultats tendent cependant à montrer que BIN1-Munc18-1 existe bien au niveau de la pré-synapse. Les PLA menées sur les neurones de souris hBIN1 montrent en effet une dérégulation de l'interaction de Munc18-1 avec son partenaire syntaxine 1. Or, l'équipe de Malenka a montré qu'altérer l'expression de la syntaxine 1 n'avait pas d'effet sur l'induction de la LTP de neurones en cultures, ce qui tend à montrer que cette syntaxine n'est pas impliquée dans le complexe SNARE post-synaptique mais uniquement dans le pré-synaptique (Jurado et al., 2013). D'autre part, la souris hBIN1 présente à trois mois une baisse de la fréquence de libération spontanée du glutamate au niveau de la collatérale de Schaffer sans atteinte de la libération évoquée (les courbes I/O des hBIN1 sont non significativement différentes des courbes I/O des WT). Les données que nous avons obtenu au niveau de la synapse CA3-CA1 indiquent un impact différentiel présynaptique. La libération spontanée et la libération évoquée du glutamate dépendent toutes deux d'un mécanisme impliquant un complexe SNARE pré-synaptique différent. La différence connue à ce jour entre les deux complexes est le type de synaptobrevine impliquée. Les deux libérations impliqueraient cependant SNAP-25 et syntaxine 1 (Kavalali, 2015). Ensemble, ces données suggèrent que BIN1 aurait un rôle dans la régulation des libérations spontanées et évoquées du glutamate, probablement via son interaction avec Munc18-1.

Au même âge, on observe une activité spontanée intacte au niveau de la voie perforante mais une atteinte de la LTP et de la courbe I/O, qui renvoie à des anomalies postsynaptiques (résultats partie 1). Il est enfin important de noter que plus de la moitié des points de la PLA BIN1-Munc18-1 ne co-localisent pas avec un marqueur synaptique, que ce soit PSD-95 ou la géphyrine. Il se peut que toutes les synapses ne soient pas marquées (pour tous les marquages testés on retrouve plus de la moitié de points qui ne co-localisent pas (DLG1-DLGAP1: 56,89%)), et qu'une partie de l'interaction se situe au niveau du tronc dendritique sans être à la synapse. De même, l'interaction est retrouvée en quantité équivalente au niveau somatique et dendritique. BIN1 aurait un rôle dans le trafic intracytoplasmique des endosomes (Leprince et al., 2003). Munc18-1 s'associe peut-être à BIN1 dans ce processus.

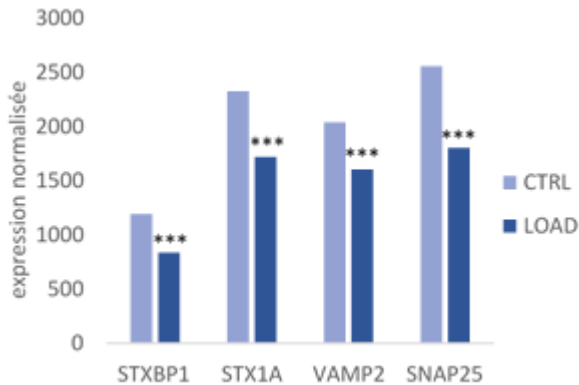
A.



B.



C.



D.

Gène	Pré-synaptique	Post-synaptique	Cortex Préfrontal	
			Adj pValue (n=4)	LogFc AD-CTR
STXBP1	X	X	9,11E-4	-0,099346225
STX1A	X		1,77E-7	-0,09935334
SNAP25	X	X	2,71E-05	-0,190483966
VAMP2	X	X	2,30E-06	-0,113659967

Figure 1 : Expression des gènes du complexe SNARE dans la maladie d'Alzheimer

(A) Munc18-1 fait partie de la machinerie de fusion pré-synaptique en interagissant avec les protéines du complexe SNARE synaptobrevine/VAMP, SNAP-25 et Syntaxine. D'après Südhof, 2013.

(B) Modèle de l'organisation des protéines SNARE régulant l'endocytose des récepteurs AMPA à l'épine dendritique : syntaxine 3 (stx3), SNAP-47 et Synaptobrevine/VAMP2 (syb-2). D'après Jurado et al. 2013.

(C) Niveau d'expression des gènes du complexe SNARE dans le cortex post-mortem d'individus contrôles (CTRL ; n=188) et de patients souffrant de MAS (LOAD ; n=176). Test Wilcoxon + correction de Bonferroni (n=4) à partir des données de microarray Illumina publiées par Webster et al. 2009.

(D) Différentiel d'expression des gènes du complexe SNARE dans le cortex préfrontal post-mortem d'individus contrôles (n=100) et de patients souffrant de MAS (n=129). Test LIMMA + correction de Bonferroni (n=4) à partir des données de microarray Affymetrix publiées par Zhang et al. 2013. Si logFc AD-CTR<0 alors CTR>AD et inversement.

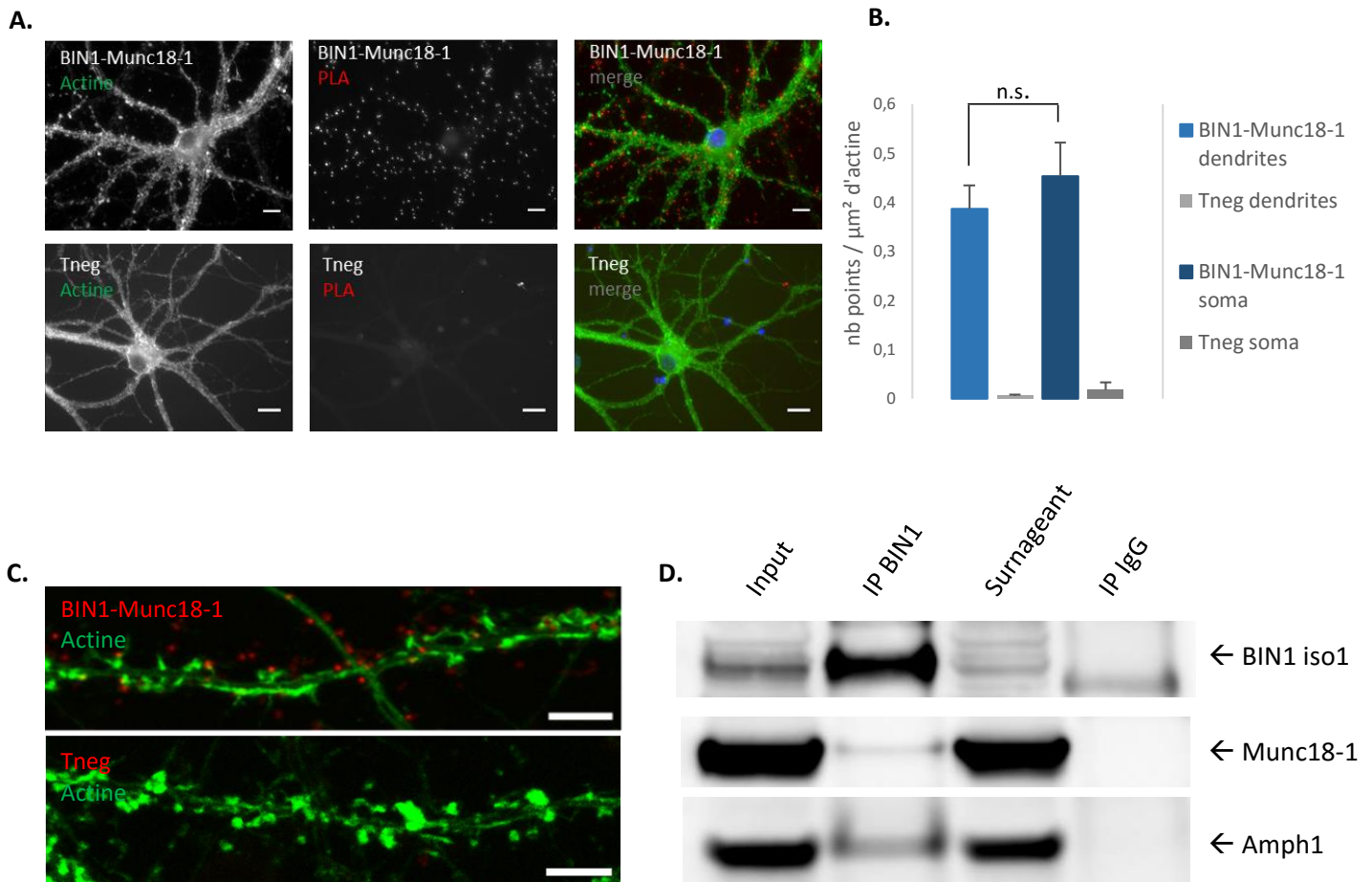


Figure 2 : Validation de l'interaction BIN1-Munc18-1

(A) Co-marquage *Proximity Ligation Assay* (rouge) BIN1-Munc18-1 ou Picalm-SMARCA2 (Tneg) et actine (vert) sur neurones hippocampaux de souris contrôles âgés de 21 jours *in vitro*. Epifluorescence 40X. Echelle 10 μm . Tneg : Témoin négatif.

(B) Quantification des points de PLA par μm^2 d'actine dans les dendrites (une dendrite par neurone) et dans le soma. Min. 10 neurones par condition. BIN1-Munc18-1 dendrites: 0,38 ; soma: 0,45 Tneg dendrites: 0,006 soma: 0,017 . Différence statistique entre BIN1-Munc18-1 et le Tneg (pValue < 0,001). Différence non statistique entre les dendrites et le soma (pValue>0,05).

(C) Co-marquage PLA (rouge) BIN1-Munc18-1 ou Tneg et actine (vert) sur neurones hippocampaux de souris contrôles âgés de 21 jours *in vitro*. Confocale 63X. Echelle 5 μm .

(D) Co-immunoprécipitation (co-IP) de BIN1 avec Munc18-1 et Amphiphysine 1 en synaptosomes de souris sauvages. Input : 40 μg de synaptosomes. Co-IP faites à partir de 400 μg de synaptosomes avec 5 μg d'anti-BIN1 ou d'IgG de souris.

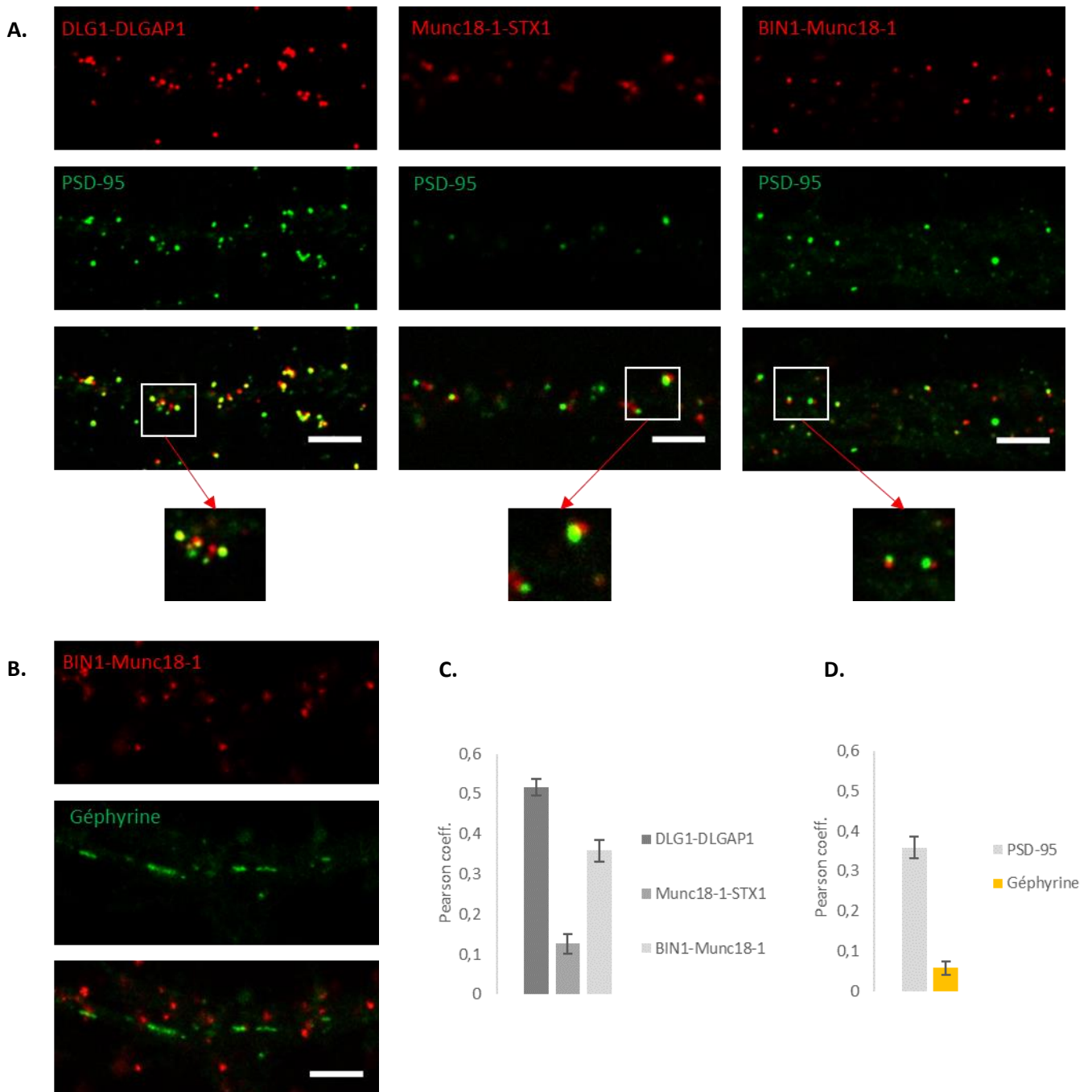


Figure 3 : Localisation subcellulaire de l'interaction BIN1-Munc18-1 : marquage pré et post-synaptique des synapses glutamatergiques

(A) Co-marquage *Proximity Ligation Assay* (rouge) DLG1-DLGAP1 (interaction post-synaptique), Munc18-1-STX1 (interaction pré-synaptique) ou BIN1-Munc18-1 et PSD-95 (vert) sur neurones hippocampaux de souris contrôles âgés de 21 jours *in vitro*. Echelle 5 μ m.

(B) Co-marquage PLA (rouge) BIN1-Munc18-1 et Géphyrine (vert) sur neurones hippocampaux de souris contrôles âgés de 21 jours *in vitro*. Echelle 5 μ m.

(C) Coefficient de Pearson moyen des interactions DLG1-DLGAP1, Munc18-1-STX1 et BIN1-Munc18-1 avec PSD-95, pour min. 10 neurones. Un coefficient supérieur à 0,3 montre une corrélation entre les deux marquages. Il y a corrélation si coeff. Pearson $\geq 0,3$.

(D) Coefficient de Pearson moyen de l'interaction BIN1-Munc18-1 avec PSD-95 et avec Géphyrine, pour min. 10 neurones.

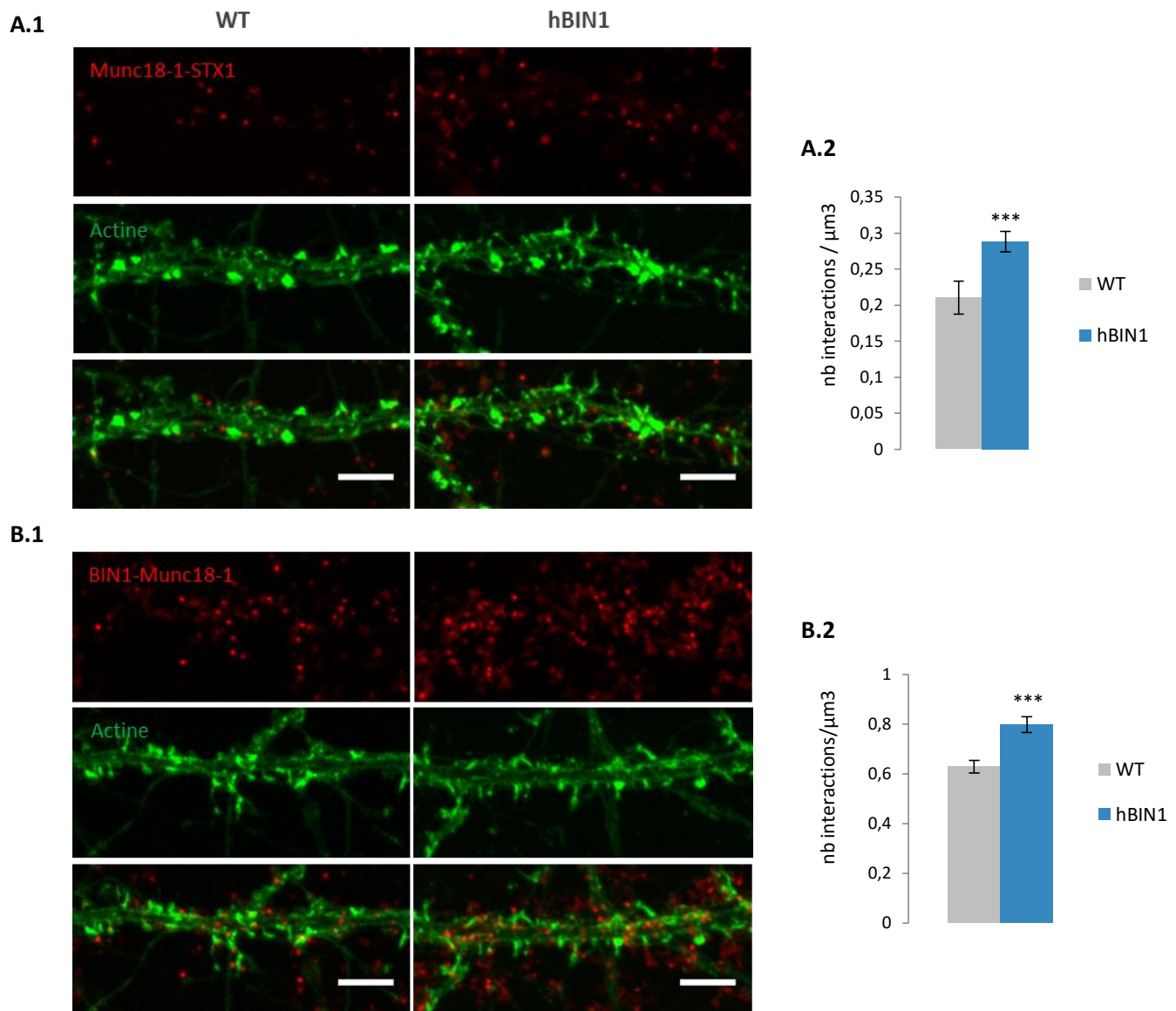


Figure 4 : BIN1-Munc18-1 & MA : implication dans le complexe SNARE

(A) 1. Co-marquage PLA (rouge) BIN1-Munc18-1 et Actine (vert) sur neurones hippocampaux de souris contrôles (WT) ou de souris hBIN1 (hBIN1) âgés de 21 jours in vitro. Echelle 5 μm .

2. Quantification des points de PLA par μm^3 d'actine pour l'interaction BIN1-Munc18-1. Moyenne des résultats de 10 neurones par embryon pour 3 embryons par génotype. (***) pValue $\leq 0,001$

(B) 1. Co-marquage PLA (rouge) Munc18-1-Stx1 et Actine (vert) sur neurones hippocampaux de souris contrôles (WT) ou de souris hBIN1 (hBIN1) âgés de 21 jours in vitro. Echelle 5 μm .

2. Quantification des points de PLA par μm^3 d'actine pour l'interaction Munc18-1-Stx1. Moyenne des résultats de 10 neurones par embryon pour 3 embryons par génotype. (***) pValue $\leq 0,001$

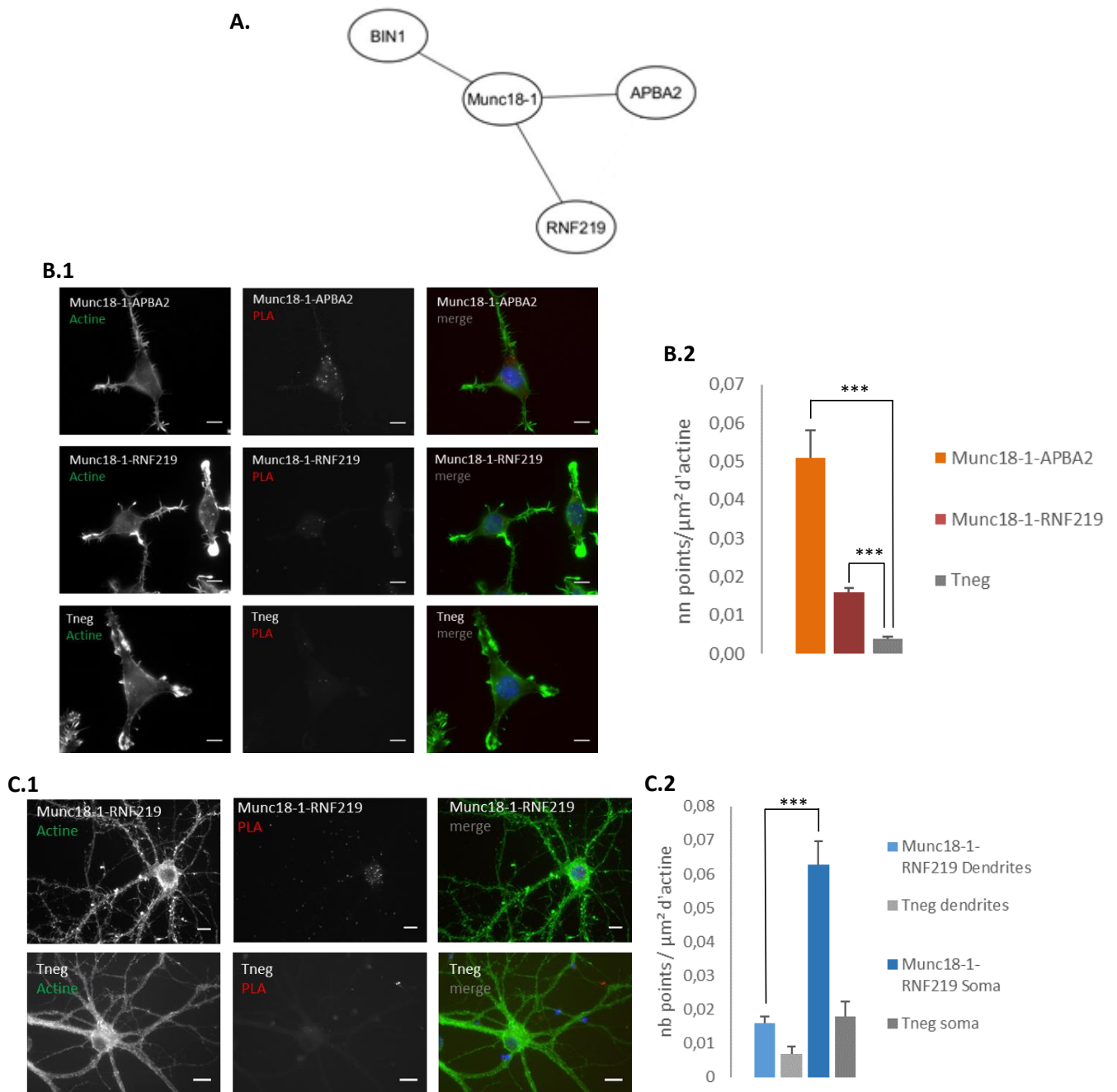


Figure 5 : Interactome Munc18-1 et Maladie d'Alzheimer

(A) Cytoscape de l'interactome de Munc18-1. Les traits pleins indiquent une interaction protéique directe validée en *Proximity Ligation Assay* (PLA).

(B) 1. Co-marquage PLA (rouge) Munc18-1-APBA2, Munc18-1-RNF219 ou Picalm-SMARCA2 (Tneg) et actine (vert) sur N18. Epifluorescence. Echelle 10 μm . **2.** Quantification des points de PLA par μm^2 d'actine de la cellule entière. Min. 20 cellules par condition. Différence statistique entre Munc18-1-APBA2 et le Tneg et entre Munc18-1-RNF219 et le Tneg (***) pValue < 0,001). Tneg : Témoin négatif.

(C) 1. Co-marquage PLA (rouge) Munc18-1-RNF219 ou Picalm-SMARCA2 (Tneg) et actine (vert) sur neurones hippocampaux de souris contrôles âgés de 21 jours in vitro. Epifluorescence. Echelle 10 μm . **2.** Quantification des points de PLA par μm^2 d'actine dans les dendrites (une dendrite par neurone) et dans le soma. Min. 10 neurones par condition. Différence statistique entre Munc18-1-RNF219 et le Tneg (pValue < 0,001) et entre Munc18-1-RNF219 dendrites et soma (***) pValue < 0,001).

DISCUSSION

Discussion de l'ensemble des résultats

Les nouvelles interactions de BIN1 que nous avons identifiées indiquent que BIN1 est impliqué dans des voies de régulation des récepteurs post-synaptiques à l'épine, que ce soit via Tiam1, KALRN (Kiryal et al., 2011) ou Munc18-1 (Jurado et al., 2013). La quantification des récepteurs glutamatergiques NR2B, GluA1 et GluA2 extracellulaires et totaux n'a cependant mis en évidence aucune variation dans le trafficking ou dans l'expression de ces récepteurs au niveau dendritique comme au niveau de l'épine dans les neurones issus des souris hBIN1 (Fig. Supplémentaire 1). A l'inverse, les études électrophysiologiques montrent une atteinte localisée à la voie perforante cortex entorhinal-gyrus denté dorsal. Une telle spécificité induit probablement une impossibilité de faire ressortir un phénotype « récepteurs » sur des cultures faites à partir de l'ensemble des structures de l'hippocampe. Il pourrait être intéressant d'effectuer des cultures organotypiques pour étudier plus finement les récepteurs glutamatergiques dans le gyrus denté versus les régions des cornes d'Ammon (CA1/2 et CA3). Les résultats du microarray effectué à partir des sous-régions dorsales et ventrales microdisséquées démontrent de plus une augmentation de l'expression des récepteurs NR2B dans le gyrus denté dorsal spécifiquement, qui pourrait être cohérente avec une nécessité de compenser le manque de NR2B membranaires par plus de synapses exprimant NR2B. Cette augmentation pourrait cependant ne pas être liée à la régulation des récepteurs membranaires NR2B, mais à une augmentation de la neurogenèse adulte (Kheirbek et al., 2012). La formation des nouveaux neurones du gyrus denté récapitule un certain nombre d'aspect du développement, comme l'expression préférentielle de la sous-unité NR2B des récepteurs NMDA (Cull-Candy and Leszkiewicz, 2004). Une augmentation de l'expression de NR2B peut donc traduire une augmentation de la neurogenèse. Les résultats du comptage de nouveaux neurones à 4h post-injection de BrdU montrent une augmentation du nombre de cellules BrdU+ chez les transgéniques par comparaison aux animaux sauvages. Ceci traduit une augmentation de la prolifération cellulaire qui pourrait être cohérente avec une augmentation de la neurogenèse du gyrus denté. Pour valider cette hypothèse, il faudrait montrer que les cellules BrdU+ sont bien des neurones et non des cellules gliales via des co-marquages BrdU / NeuN et BrdU / GFAP. Par manque de temps, cette expérimentation n'a pas été effectuée mais est encore en cours au laboratoire. Il serait également important de mener ce même type d'expérimentation à 4 semaines post-injections, afin de savoir s'il y a une baisse de la survie des nouveaux neurones, ce qui pourrait expliquer l'augmentation de leur production.

Il est donc possible que la régulation des récepteurs glutamatergiques à la membrane de l'épine ne soit pas dérégulée chez les souris hBIN1. Tiam1 et Kalirin sont des GEF (guanine exchange factor) de Rac1. Les expériences visant à évaluer l'activité Rac1 dans l'hippocampe total des souris montrent une augmentation significative de Rac1-GTP. Ces données sont en faveur de l'impact d'une voie BIN1/TIAM/RAC1 sur le cytosquelette d'actine comme montré pour le 'signalosome' DISC1/KALRN/RAC1 (Hayashi-Takagi et al., 2010). De manière cohérente avec cette hypothèse, l'étude de la morphologie des épines sur coupes de tissu et sur neurones primaires (Fig. Supplémentaire 2) montre une dérégulation de la morphologie des épines.

La voie BIN1-Munc18-1-APBA2 /RNF219 pourrait quant à elle être impliquée dans la production de l'APP. APBA2 et RNF219 ont en effet été associés à la régulation de la production du peptide A β (Ho et al., 2008; Lee et al., 2004; Rhinn et al., 2013). Il serait ainsi intéressant d'étudier la pathologie A β chez la souris hBIN1. Les atteintes comportementales et électrophysiologiques sont cohérentes avec un modèle du stade pré-symptomatique de la pathologie. A ce stade, des espèces solubles d'A β pourraient être responsables des légères atteintes cognitives observées chez les patients (Dodart et al., 2002; Selkoe, 2002). L'application d'A β sur des neurones corticaux induit l'augmentation de l'endocytose des récepteurs NR2B (Snyder et al., 2005): en interagissant avec le récepteur nicotinique α -7, A β induirait la déphosphorylation des récepteurs NMDA ce qui provoquerait leur endocytose et ainsi une atteinte de la LTP.

Discussion du modèle hBIN1

Nous cherchions à mimer la surexpression de BIN1 mise en évidence chez les patients. L'utilisation du BAC humain nous a permis d'induire une surexpression de BIN1 sans modifier le système souris et ainsi d'observer l'effet du gène humain. La qPCR menée à partir des ARN des différentes structures de l'hippocampe montre cependant une dérégulation fine de l'expression de BIN1 souris dans le gyrus denté dorsal et ventral (augmentation chez le transgénique) ainsi que dans le CA3 et le CA1/2 ventral (baisse chez le transgénique). L'explication de ces dérégulations dépend probablement de l'interaction de l'expression du BAC humain avec l'environnement moléculaire des différentes structures de l'hippocampe car on n'observe pas de corrélation directe entre les niveaux d'expression du BIN1 humain et du BIN1 souris dans les structures. Ces dérégulations de BIN1 souris complexifient l'interprétation des résultats. Il pourrait ainsi être intéressant d'étudier ce modèle après avoir inactivé le gène souris pour ne voir que l'effet des 3 copies du gène humain dans le système souris.

Les résultats de la qPCR menées à partir des ARN extraits des régions micro-disséquées de l'hippocampe des souris hBIN1 versus sauvages ont été effectuées structure par structure et ne

permettent donc pas la comparaison de l'expression d'un gène d'une structure à l'autre. Le microarray quant à lui est spécifique de la souris et ne permet donc pas de voir l'expression du gène BIN1 humain. Afin d'étudier l'expression du BAC BIN1 humain dans l'ensemble des régions du cerveau, nous avons initié un projet d'hybridation in situ en dessinant des sondes reconnaissant le gène BIN1 humain. Le gène BIN1 présente un important épissage alternatif. Pour distinguer l'expression des différentes isoformes, j'ai dessiné une sonde spécifique de la forme neuronale de BIN1, une sonde spécifique des formes ubiquitaires, et une sonde spécifique de la forme musculaire (Fig. Supplémentaire 3). L'expérience d'hybridation in situ, actuellement en prévision au laboratoire, permettra ainsi de connaître l'expression du BAC humain dans les différentes structures du cerveau de la souris hBIN1 en visualisant le pattern d'expression de ses différentes isoformes.

CONCLUSION

La Maladie d'Alzheimer Sporadique (MAS) est à ce jour la cause majoritaire de démence à travers le monde. Cette pathologie est aujourd'hui une question de santé publique avec des conséquences économiques et sociales du fait du vieillissement de la population et du coût de la prise en charge des patients. Les études visant à élucider les mécanismes moléculaires de cette maladie se basent pourtant majoritairement sur des modèles animaux de la forme familiale, qui ne représente que 2% des cas de Maladie d'Alzheimer (MA).

Cette thèse a eu pour objectif, d'une part, d'explorer de nouvelles voies de signalisation pouvant être impliquées dans la MAS, et d'autre part, de décrire un nouveau modèle transgénique de cette pathologie après les modèles basés sur le gène APOE.

L'ensemble de ses résultats a permis d'inscrire la protéine BIN1, dont le gène représente le second locus de susceptibilité pour la MAS après APOE, dans un interactome synaptique impliqué dans la régulation de deux marqueurs majeurs de la physiopathologie de la MAS : la morphologie des épines dendritiques et la régulation du peptide amyloïde β , et de les relier à une atteinte du cortex entorhinal latéral, la première structure impactée chez les patients.

Au total, l'ensemble des résultats de la thèse met en évidence des voies de signalisation impliquées dans la phase pré-symptomatique de la maladie. Ces voies sont des cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement de la Maladie d'Alzheimer Sporadique.

DONNEES SUPPLEMENTAIRES

Tableaux et figures supplémentaires

Troubles comportementaux dans la MA

Opposition	Attitude verbale ou non verbale de refus d'accepter des soins, de s'alimenter, d'assurer son hygiène, de participer à toute activité.
Agitation	Comportement moteur ou verbal excessif et inapproprié.
Agressivité	Comportement physique ou verbal menaçant ou dangereux pour l'entourage ou le patient.
Comportements moteurs aberrants	Activités répétitives et stéréotypées, sans but apparent ou dans un but inapproprié.
Désinhibition	Comportement inapproprié par rapport aux normes sociales ou familiales.
Cris	Vocalisations compréhensibles ou non, de forte intensité et répétitives.
Idées délirantes	Perceptions ou jugements erronés de la réalité, non critiqués par le sujet.
Hallucinations	Perceptions sensorielles sans objet réel à percevoir, alors que les illusions sont des déformations ou des interprétations de perceptions réelles. Elles sont le plus souvent visuelles.
Troubles du rythme veille/sommeil	Troubles de la durée, de la qualité du sommeil, mais aussi par une inversion du cycle jour/nuit.

Tableau Supplémentaire 1 : Troubles comportementaux dans la maladie d'Alzheimer.

Tableau adapté des Recommandations de bonne pratique de la Haute Autorité de Santé (HAS) pour la prise en charge des troubles du comportement perturbateurs dans la MA et les maladies apparentées, publiées en mai 2009 (<http://www.has-sante.fr/>).

Mutation	Neuropathologie	Effets biologiques	Région génomique	Modèles animaux	Article de référence
KM670/671NL <i>(Suédoise)</i>	Atrophie généralisée, élargissement des sillons et des ventricules.	Augmentation A β total; augmentation production et sécrétion d'A β 40 et A β 42.	Exon 16	oui	Mullan et al., 1992
A673V	Plaques amyloïdes, neurofibrilles (stade Braak VI). Angiopathie amyloïde cérébrale	In vitro, augmentation de l'agrégation d'A β	Exon 16	non	Di Fede et al., 2009
D678H <i>(Taiwanaise)</i>	Inconnu	Augmentation de la sécrétion d'A β 40 et A β 42, et augmentation du rapport A β 40/A β 42 en milieu conditionné.	Exon 16	non	Chen et al., 2012
D678N <i>(de Tottori)</i>	Atrophie corticale, atrophie de l'hippocampe	Accélération de l'oligomérisation d'A β	Exon 16	non	Wakutani et al., 2004
E682K <i>(de Leuven)</i>	Atrophie bilatérale de l'hippocampe	Augmentation d'A β total et du ratio A β 42/A β 40	Exon 16	non	Zhou et al., 2011
K687N	Atrophie cérébrale globale légère. Tau et P-Tau augmentés et A β 1-42 abaissé dans le CSF.	Réduit le clivage d'APP par l' α -sécrétase. Moins de production d'APPs. Augmentation d'A β 40 et A β 42.	Exon 16	non	Kaden et al., 2012
A692G <i>(Flammande)</i>	Plaques amyloïdes et angiopathie amyloïde cérébrale	Augmentation vitro de la sécrétion d'A β 42 et A β 40	Exon 17	non	Hendriks et al., 1992
E693del <i>(d'Osaka)</i>	Inconnu	Baisse d'A β 42 et A β 40	Exon 17	oui	Tomiya et al., 2008
E693G <i>(Artique)</i>	Plaques amyloïdes et neurofibrilles	Augmentation de l'oligomérisation d'A β 40	Exon 17	oui	Kamino et al., 1992; Nilsberth et al., 2001

D694N <i>(de l'Iowa)</i>	Plaques amyloïdes et lésions neurofibrillaires	Augmentation de l'oligomérisation d'Aβ40	Exon 17	oui	Grabowski et al., 2001
A713T	Atrophie corticale, neurofibrilles, plaques amyloïdes, angiopathie amyloïde.	Pas de changement du ratio Aβ42/Aβ40 dans les cerveaux post-mortem.	Exon 17	non	Carter et al., 1992 Armstrong et al., 2004
T714A <i>(Iranienne)</i>	Atrophie corticale, lésions de la matière blanche	Inconnu	Exon 17	non	Pasalar et al., 2002
T714I <i>(Autrichienne)</i>	Perte neuronale, gliose diffuse, neurofibrilles, plaques amyloïdes	Augmentation du ratio Aβ42/Aβ40 et d'Aβ42, baisse d'Aβ40	Exon 17	oui	Kumar-Singh et al., 2000
V715A <i>(Allemande)</i>	Hypoperfusion de la région pariéto-occipitale	Augmentation du ratio Aβ42/Aβ40	Exon 17	non	Cruts et al., 2003
V715M <i>(Française)</i>	Atrophie corticale, hypométabolisme	Baisse de la production d'Aβ40, pas de variation d'Aβ42	Exon 17	non	Ancolio et al., 1999
I716F <i>(Ibérique)</i>	Neurofibrilles, plaques amyloïdes, corps de Lewy.	Augmentation d'Aβ42 et du ratio Aβ42/Aβ40; Baisse d'Aβ40.	Exon 17	oui	Guerreiro et al., 2010
I716T	Inconnu	Inconnu	Exon 17	non	Terreni et al., 2002
I716V <i>(de Floride)</i>	Atrophie corticale	Augmentation d'Aβ42(43) et du ratio Aβ42(43)/Aβ40	Exon 17	oui	Eckman et al., 1997
V717F <i>(d'Indiana)</i>	Inconnu	Augmentation du ratio Aβ42/Aβ40	Exon 17	oui	Murrell et al., 1991

V717G	Non décrit	Augmentation du ratio A β 42/A β 40 et d'A β 42; baisse d'A β 40.	Exon 17	non	Chartier-Harlin et al., 1991
V717I <i>(Londonienne)</i>	Variable, angiopathie amyloïde légère, plaques amyloïdes, neurofibrilles, corps de Lewy	Augmentation du ratio A β 42/A β 40 et d'A β 42, baisse A β 40.	Exon 17	oui	Goate et al., 1991
V717L	Inconnu	Augmentation du ratio A β 42/A β 40 et d'A β 42, baisse A β 40.	Exon 17	non	Murrell et al., 2000
T719P	Inconnu	Baisse d'A β total dans le CSF	Exon 17	non	Ghidoni et al., 2009
L723P <i>(Australienne)</i>	Inconnu	Augmentation d'A β 42 in vitro	Exon 17	non	Kwok et al., 2000
K724N <i>(Belge)</i>	Plaques amyloïdes dans le cortex cérébral.	Augmentation du ratio A β 42/A β 40 et d'A β 42, baisse A β 40.	Exon 17	non	Theuns et al., 2006

Tableau Supplémentaire 2 : Les mutations pathogéniques de l'APP.

Adapté de <http://alzforum.org/mutations>

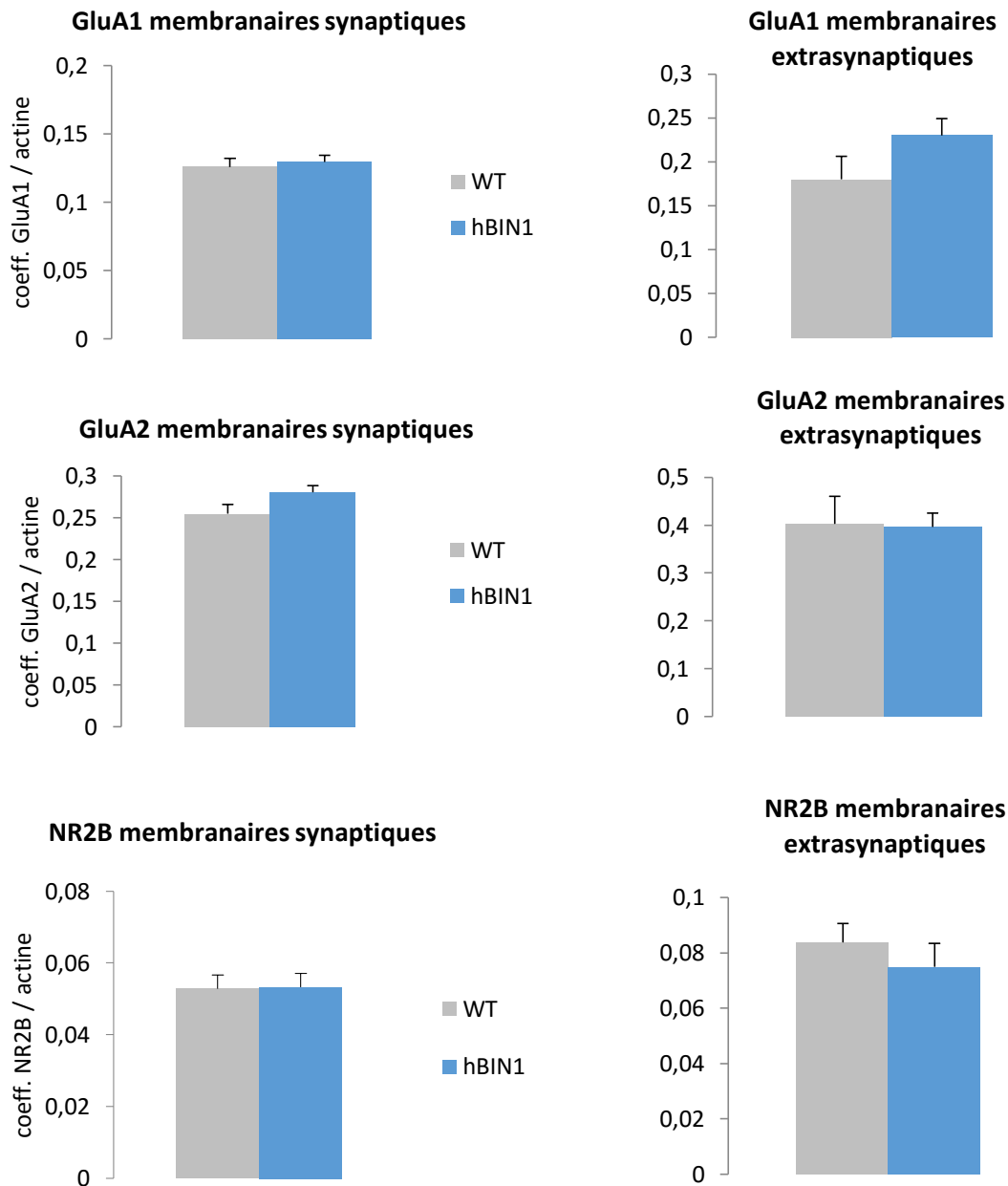


Figure Supplémentaire 1 : Quantification de récepteurs glutamatergiques membranaires

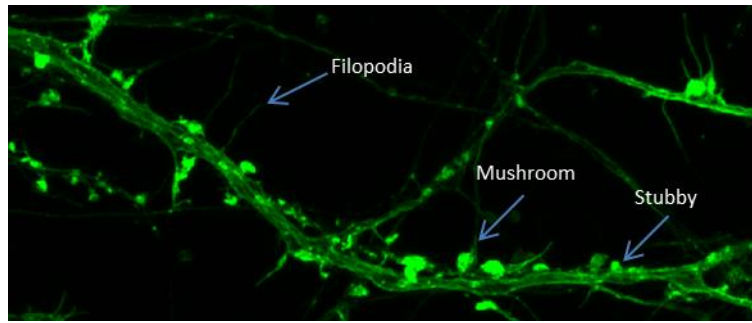
Les sous-unités des récepteurs glutamatergiques GluA1, GluA2 et NR2B ont été quantifiées à partir des co-marquages des fractions extracellulaires de ces récepteurs (anticorps visant la partie extracellulaire de la protéine et absence de perméabilisation lors de l'immunomarquage) et de l'actine (Phalloïdine Alexa 488) sur des neurones primaires âgés de 21 jours in vitro de souris sauvages (WT : wild type) ou hBIN1.

Les zones synaptiques et extra-synaptiques ont été définies par le biais de ROI (Region of Interest) où les volumes de chaque marquage ont été quantifiés grâce au logiciel Volocity. Le résultat est exprimé en moyenne du volume de marquage du récepteur rapporté au volume d'actine (μm^3).

Les quantifications sont basées sur des images de confocale, zoom 63X, avec un pas de Z permettant une reconstruction 3D des dendrites et épines.

L'ensemble des résultats montre une absence de modifications de la quantité des récepteurs glutamatergiques à la membrane, que ce soit au niveau de l'épine ou du tronc dendritique.

A.



B.

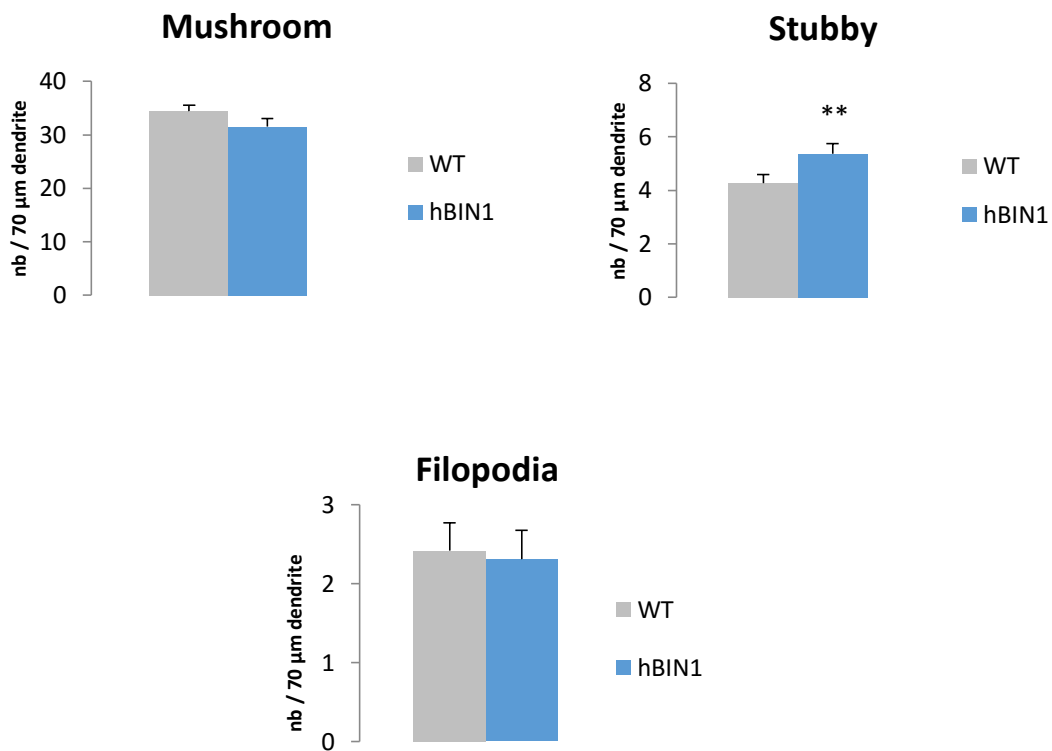


Figure Supplémentaire 2 : Morphologie de épines dans les neurones des souris hBIN1 et WT

A. Image type représentant les différents types d'épines comptabilisées : les mushroom, les stubby, et les filopodia.

B. Quantification des trois types d'épine. Moyenne du nombre de chaque type d'épine pour 70 μm de dendrite pour min. 5 portions de dendrite par embryon et pour n=5 embryons sauvages (WT, wild type) et n=7 embryons transgéniques (hBIN1). La Phalloïdine Alexa 488 a été utilisée pour marquer l'actine. Les images ont été acquies au confocale, zoom 63X, avec un pas en Z permettant une reconstruction 3D des épines pour le comptage. On observe une augmentation significative des épines stubby (wt : 4,26 ; 5,36 ; **pvalue : 0,029), une tendance à la baisse de la quantité des épines mushroom (wt : 34,4 hBIN1 : 31,5 ; pvalue : 0,129) et une quantité inchangée de filopodia.

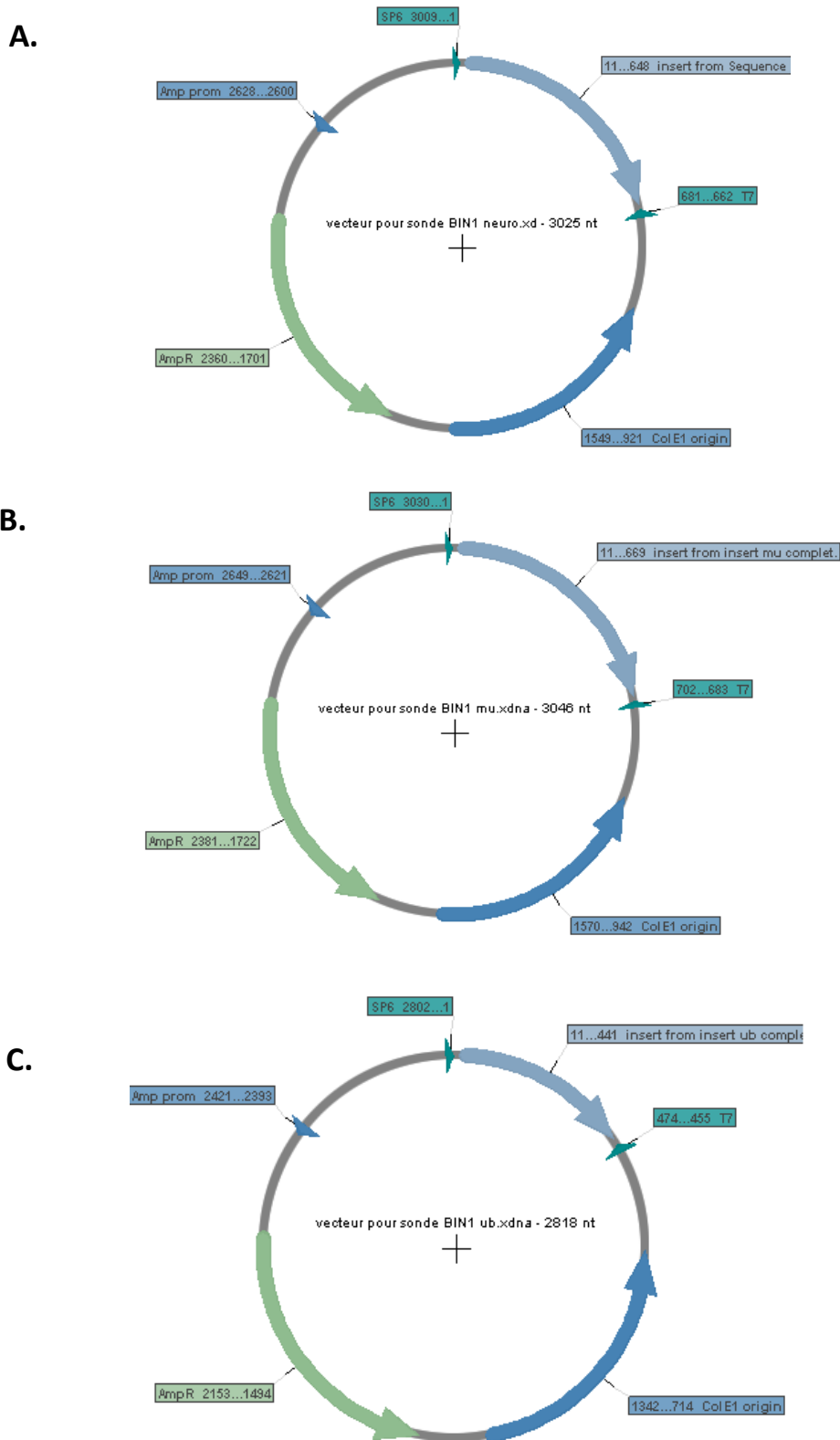


Figure Supplémentaire 3 : Cartes des vecteurs de transcription in vitro pour Hybridation in situ de BIN1. Les inserts BIN1 neuronal (A), BIN1 musculaire (B) et BIN1 ubiquitaire (C) ont été produits par PCR à partir de vecteurs d'expression des isoformes humaines 1, 8 et 9 respectivement, et ont été insérés dans un vecteur pSp73. Ces vecteurs de transcription in vitro ont été conçus pour être utilisés avec le kit Promega Riboprobe System Sp6/T7 P1460 avec une digestion BglII/XhoI (sites de restriction absents des inserts).

Article 2: “Big Data” in neuroscience: open door to a more comprehensive and translational research

Le projet européen AgedBrainSysbio a organisé, en février 2015 à Genève, le symposium “Advances in Systems Biology in Neurosciences”. Nous avons, avec Nicolas Le Novère et Audald Lloret-Villas, pris en charge la rédaction du résumé de ce symposium, qui sera prochainement publié par le journal Big Data Analytics.

“Big Data” in neuroscience: open door to a more comprehensive and translational research

Audald Lloret-Villas (audaldlloret@gmail.com)^{1,*}, Rachel Daudin (rachel.daudin@gmail.com)^{2,4,*}, Nicolas Le Novère (n.lenovere@gmail.com)³

1. EMBL – European Bioinformatics Institute, Wellcome-Trust Genome Campus, Cambridge, United Kingdom

2. Centre Psychiatrie et Neurosciences, INSERM U894 and Université Paris Descartes, 75014 Paris, France

3. The Babraham Institute, Cambridge, United Kingdom

4. Hybrigenics Services SA, Paris, France

* both authors contributed equally to the work

Abstract

The International Symposium “Advances in Systems Biology in Neurosciences” was held in February 2015 in Geneva. A hundred scientists with a variety of expertise gathered around the theme of human brain complexity and cognitive disorders. Through a series of lectures and poster sessions, the symposium showcased state-of-the-art high-throughput biotechnologies, supercomputers and neuroimaging, and illustrated the latest advances in systems approaches to tackle Neurosciences and Neurodegenerative disorders. The meeting highlighted the power of big data to understand complex pathologies and also the need for more open and integrated data.

Keywords

Systems Biology; imaging; data integration; modeling; alzheimer; parkinson

Over the last two decades, research in life sciences experienced a paradigm shift, adding to the very successful reductionist analysis of isolated entities (molecules, cells, organs) the study of interacting entities, called “Systems Biology”. Neuroscience pioneered the systems approaches and is now pushing the boundaries of multi-scale descriptions, from the molecule to the disease [1]. The human brain contains about 100 billions neurons [2], connected by 1 quadrillion synapses. Understanding brain function, and disorders, as well as designing treatments requires gathering enormous amounts of heterogeneous data. The challenges faced range from collection and annotation to storage and integration.



Figure 1: *Geneva Biotech campus*

On Friday, February 6, 2015 in Geneva was held the International Symposium “Advances in Systems Biology in Neurosciences”, funded by the European Commission through the AgedBrainSYSBIO project and jointly sponsored by the Vital-IT/Swiss-Prot groups of the Swiss Institute of Bioinformatics (SIB), Novartis and Roche. The meeting brought together clinicians, biologists, bioinformaticians, and statisticians from different European-funded consortia such as AgedBrainSYSBIO, SynSys, the European flagship Human Brain Project (HBP), and also US projects such as the Alzheimer’s Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) and the Allen Institute for Brain Science. This international assembly of scientists was gathered in the high-tech building that hosts the HBP and SIB on the Campus Biotech of Geneva (formerly Merck-Serono). Through a series of lectures and poster sessions, the symposium showcased to the attendees state-of-the-art approaches, including high-throughput biotechnologies, supercomputers and neuroimaging, and illustrated the latest advances in systems approaches to tackle Neurosciences and Neurodegenerative disorders. This was an opportunity for more than one hundred researchers and students from academia and industry to gather and share their knowledge in the field. The first authors of this report are students in partners of AgedBrainSYSBIO. Attendance to this meeting allowed them to be exposed to the foremost research in the systems biology of neuronal systems. Professor Michel Simonneau (Centre de Psychiatrie et Neurosciences, INSERM U894, coordinator of AgedBrainSYSBIO) and

Ioannis Xenarios (SIB Group Leader, head of Vital-IT and Swiss-Prot) opened the meeting with welcoming remarks.



Figure 2: Sean Hill, from the EPFL (Lausanne, Switzerland)

The first session, moderated by Dr Le Novère, from the Babraham Institute, Cambridge, UK), began with a keynote presentation by Dr. Sean Hill, co-Director of the Blue Brain Project [3] and co-Director of Neuroinformatics in the European Union funded Human Brain Project (HBP) at the École Polytechnique Fédérale de Lausanne (EPFL). This large project (involving more than 250 researchers), supported by EU information technology funding, aims to provide innovative tools to the global Neuroscience community in order to model and simulate the human brain. Sean Hill, one of the coordinators of this flagship European program, introduced the audience with an impressive data infrastructure built over the first 10 years of work. Electrophysiological recordings, gene expression patterns, morphological studies, among others, are stored and integrated with rich semantic metadata in order to inform mathematical models of neuronal circuits. He then presented preliminary simulations of the electrical behavior of neocortical columns, built upon the compilation of the large amount of data described above [4]. Such complex models require large amount of storage and computing power (the simulations are currently using a Blue Gene computer). The HBP still faces significant challenges when developing a platform to generate and make accessible for the whole community the huge amount of data required for understanding the entire brain function.

Dr. Yann Hérault, head of the Institut Clinique de la Souris (ICS) and research group leader at the Institut de Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire (IGBMC) in Illkirch,

France, presented the second lecture about a large mouse aneuploidy zoo. His talk described efforts to decipher the physiopathology of Intellectual Disabilities [5] using mouse models of human trisomy 21. A complete and standardized characterization of each model is provided (behavior, gene expression, pathways manipulations) in order to understand the role of different chromosome 21 regions implicated in cognitive defects. These mouse models help understand the pathophysiology of trisomy 21, and also of related neurological disorders.

Dr. Maksym V. Kopanitsa, from the biotechnology company Synome, a spin-off from the Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, UK) presented his company's work. Expert on high throughput analysis of synaptic function and cognition, he has been involved in different European projects (EUROSPIN, SynSys, GENCODYS and PharMEA). The company specializes in multiple electrophysiological recordings and has developed useful scoring algorithms describing the importance of each protein in synapse activity. Using mouse models mutated for genes encoding key proteins of pre- and post-synaptic compartments, Synome aims to describe the role of each of these proteins [6].

The last speaker of the first session was Dr Le Novère. To understand the function of the synapse, and in particular its plasticity, at the molecular level, his group develops mathematical models and numerical simulation. His presentation focused on the response of synaptic protein kinases to calcium signals. He described in particular mechanistic allosteric models of calmodulin, based on the thermodynamic equilibrium between the two conformations of calmodulin's lobes [7]. These models were then placed in the context of the synapse, to obtain a proper simulation of calcium signal dynamics. Finally, biochemical and electrophysiological models can be integrated in large detailed models of entire neurons [8]. Such models permit to integrate existing knowledge and test our hypothesis about neuronal function.

Dr Jane Ann Driver from Brigham and Women's Hospital (Boston, MA, USA) opened the second session, chaired by Prof. Michel Simonneau. Dr. Driver's talk shed light on the correlation between different diseases and their impact. Epidemiological evidences suggest an inverse association - that is a negative correlation - between the presence of cancer and the most common neurodegenerative conditions, such as Alzheimer's disease (AD) and Parkinson's Disease (PD) [9]. She underlined how difficult it was to assess such association, due to many biases induced by treatments, lack of reporting and cancer-induced death. She then presented results supporting the involvement of Pin1, a protein known to promote cellular health by restoring phosphorylated Tau and amyloid precursor protein to a functional state [10]. Dr. Driver also described a mouse knock-out model for the gene encoding the Pin1 protein, cancer-resistant and more sensitive to neurodegenerative and aging disorders. Understanding inverse comorbidities and predicting them is crucial to choose treatments. Their detection relies on large epidemiological data. The more we have, the better the detection, understanding and treatment.

Figure 3: *Jane Ann Driver, from Brigham and Women's Hospital (Boston, MA, USA)*



Following Dr. Driver, prof. Tal Pupko from the Department of Cell Research & Immunology, Tel-Aviv University (Tel-Aviv, Israel) focused his talk on the differential selection of genes related to neurodegenerative diseases. Using a bioinformatics pipeline, they found (in collaboration with researchers from the Centre Psychiatrie & Neurosciences, INSERM U894) an important enrichment of positively selected genes in those pathologies. Positive selection is mainly found when genes drift due to pressures in new environments. Such work on human-specific gene evolution may point to limitations of using distant animal models, which might have experienced different selection pressures.

Dr. Hervé Rhinn from the Department of Pathology & Cell Biology, Columbia University Medical Center (Columbia, NY, USA) then talked about variants in the human genome linked to the risk of developing non-familial AD and PD. Application of bioinformatics techniques, such as Differential Co-expression Analysis to whole transcriptome gene expression data, enables the study of expressed and non-expressed genetic components. These tools revealed the role of genetic components in key processes of neurodegeneration including alpha-synuclein regulation in PD [11] and the impact of RNF219 gene as a mediator of the effect of APOE-E4 in AD [12].

Prof. Simonneau concluded the second session with a presentation centered on using protein-protein Interactions to understand neuronal diseases. He presented regulatory networks obtained from large-scale hypothesis-free analysis such as yeast two-hybrids, whole-genome sequencing and epistatic linkage analysis. These networks linked several genes identified in Schizophrenia and Late-Onset Alzheimer's disease

– Genome-wide association studies (LOAD-GWAS). He then described his group's efforts to validate this network on mouse brain tissue and primary neurons. They used endogenous immunoprecipitation, proximity ligation assays, electrophysiology and behavior on a novel transgenic model that overexpresses human BIN1 and thus mimicks BIN1 changes found in LOAD patients. Neurodegenerative pathologies are "network diseases". The analysis of large networks of physical or functional interactions between genes and proteins permits to discover new molecular causes to the diseases, better understand their development and also suggest targets for treatments.

Dr. James Adjaye from the University of Düsseldorf (Düsseldorf, Germany) moderated the third and last session of the Symposium.

The opening talk was given by Prof. Arthur W. Toga from the Center for Computational Biology, USC (Los Angeles, CA, USA). Prof. Toga leads the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) that produced a unique set of open-access databases of genetics, biomarkers and imaging [13]. Because of the ever increasing size of existing and emerging databases, Prof. Toga emphasized the importance of the treatment and description of the data in order to enable their meaningful comparison and integration. Shared and unified ontologies are becoming key to validate analysis results obtained from combining different sources. Integration of genetic and neuroimaging data will be key to understand Alzheimer's disease. However the linkages are often complex, and more data is needed, from more patients, for all effects to be detectable. The talk thus ended with the presentation of the Global Alzheimer's Association Interactive Network (GAIN), a set of analytical tools and computational resources to connect AD scientists worldwide [14]. Such a large scale sharing of data across the world promises to speed up research on the disease.

Dr. Jean-François Demonet from the Leenaards Memory Centre CHUV, Lausanne University (Lausanne, Switzerland) then gave a presentation on the role of neuropsychology of Ageing-Brain Cognitive Diseases (ABCDs) as a complement to the promising era of biomarkers. He highlighted the lack of data on diagnosis of ABCDs and called for a set of reliable cognitive tests to detect and identify the main conditions. Being able to detect such diseases early will improve treatment and care.

Dr. Jérôme Dauvillier, from the SIB (Lausanne, Switzerland), discussed the analysis of epistatic effects - the effect of a genetic variant that depends on the presence of another genetic variant - to understand the physiopathology of Alzheimer's Disease. He first described an epistatic analysis of two patient cohorts (TGen and HBTRC) based on genotyping data linked with the Braak Score (distribution of neurofibrillary tangles). A Gene Ontology enrichment analysis showed that the epistatic genes are linked to synapses, axonal guidance, and cell-cell adhesion. Dr. Dauvillier also presented an epistasis analysis based on whole-genome sequencing and ADNI's data consortium, providing many perspectives, taking advantage of their unique computing

facilities (ViTal-IT). This kind of analysis brings information on gene-gene interactions in AD pathophysiology by complementing the more classical approaches of GWAS. Although crucial to understand the complex genetic basis of Alzheimer disease, the number of statistical tests required by epistatic analyses explodes with the number of variants involved and requires large amounts of computing power.

This last session ended with a lecture from Dr. Adjaye, who presented his group's efforts on investigating disease mechanism using induced Pluripotent Stem Cells (iPSC) from AD patients [15]. Indeed, direct biochemical observation of living patients is impossible. Producing neurons from those patient using reprogrammed cells (generally blood or skin cells) provided an alternative. Dr Adjaye was able to differentiate the iPSCs into neuronal cells and to detect the expression of p-Tau and GSK3 β . Transcriptome analysis of AD-iPSC derived neuronal cells revealed significant changes in the expression of genes associated with AD, such as APOE, APP or PSEN. Dr. Adjaye finally described his group's work on neuronal cells derived from patient having rare variants of susceptibility genes such as TREM2. Such human cellular models present an alternative to animal models to understand molecular and cellular aspects of the disease.

Ioannis Xenarios concluded the meeting thanking all the participants of the symposium.

Breaks for lunch and refreshments took place around posters, allowing everyone to ask questions and provide feedback to their authors. The posters covered a large variety of topics, from fluorescence microscopy in exocytosis to mathematical modelling of neurodegeneration or protein overexpression on pathophysiology. Three poster authors were selected to present their works to the audience. PhD student Wenjia Wang from PHARNEXT (Issy-Les-Moulineaux, France) took the opportunity to present a multi-marker genetic association test based on the Rasch model that provides new insights into the genetics of Alzheimer's Disease. Claire Lesieur from the École Normale Supérieure Systèmes Complexes de Lyon IXXI (Lyon, France) talked about natural "Smart" material from proteins. Computer prediction of conformational changes of proteins involved in neuronal diseases will lead to engineered folded mutant proteins able to interact with misfolded forms and avoid their aggregation. Finally, Dr. Lavinia Alberi from the Unit of Anatomy Department of Medicine - UNIFR (Fribourg, Switzerland) presented her results suggesting the implication of Notch1 in neural plasticity and neurodegeneration.

This symposium brought together scientists with a variety of expertise around the theme of human brain complexity and cognitive disorders. Despite aiming towards the same goal - a better understanding of neurodegenerative conditions -, the speakers provided the audience with very different but promising approaches. The only commonalities were the need to consider the role of parts within a system, and the interplay between experimental and computational investigations. For years, the

scientific community has tried to explain complex and multifactorial pathologies like Alzheimer's disease by exploring a unique aspect of the pathology (neurodegeneration, immune defects, metabolism disorders) or the effect of given genes and proteins. Whereas a more comprehensive approach based on large-scale heterogeneous dataset is certainly needed. Big Data has entered biologists everyday life, and they tend to generate and use an every growing amount of such information. This symposium showed how such high-throughput data, from genotypes to imaging, including gene expression, proteomics, physiological recordings, can be useful to develop new biological hypothesis and test them in mathematical models. It also showed the huge work that represents data curation and management. Even if, as Pr. Toga underlined it, one should keep in mind that these approaches are providing associations and not causalities, Big Data is opening the door to a more translational science, a better communication between the different fields (animal models, clinical trial, mathematics and bioinformatics). This day was a good representation of such an evolution of scientific research and the associated promises, as recognized by international organization such as OECD [16]. However, despite the existence of a so-called data deluge, we do not in fact have enough data to understand complex pathologies and in particular neurodegenerative diseases. We need more data, more open, and better integration.

List of Abbreviations used

ABCDs:	Ageing-Brain Cognitive Diseases
AD:	Alzheimer's disease
ADNI:	Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative
EPFL:	École Polytechnique Fédérale de Lausanne
GAAIN:	Global Alzheimer's Association Interactive Network
HBP:	Human Brain Project
iPSC	induced Pluripotent Stem Cells
IGBMC:	Institut de Génétique Biologie Moléculaire et Cellulaire
LOAD-GWAS:	Late-Onset Alzheimer's disease – Genome-wide association studies
PD:	Parkinson's Disease
SIB:	Swiss Institute of Bioinformatics

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author's contributions

All authors participated the workshop and contributed to the writing of this document. All authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

ALV and RD are supported by the European Union Seventh Framework Programme AgedBrainSYSBIO grant agreement 305299 <http://www.agedbrainsysbio.eu/>

References

1. Le Novère N. **The long journey to a Systems Biology of neuronal function.** *BMC Systems Biology.* 2007; **1**: 28. doi:10.1186/1752-0509-1-28
2. Azevedo FAC, Carvalho LRB, Grinberg LT, Farfel JM, Ferretti REL, Leite REP, *et al.* **Equal numbers of neuronal and non-neuronal cells make the human brain an isometrically scaled-up primate brain.** *Journal of Comparative Neurology.* 2009; **513**(5): 532-541 doi: 10.1002/cne.21974
3. Markram H. **The blue brain project.** *Nature Reviews Neuroscience.* 2006; **7**:153–160. doi:10.1038/nrn1848
4. Markram H, Muller E, Ramaswamy S, Reimann MW, Abdellah M, Sanchez CA *et al.* **Reconstruction and Simulation of Neocortical Microcircuitry.** *Cell.* 2015; **163**(2): 456-492. doi: 10.1016/j.cell.2015.09.029.
5. Sahún I, Marechal D, Pereira PL, Nalesso V, Gruart A, Garcia JM, Antonarakis SE, Dierssen M, Herault Y. **Cognition and hippocampal plasticity in the mouse is altered by monosomy of a genomic region implicated in down syndrome.** *Genetics.* 2014; **197**:899–912. doi:10.1534/genetics.114.165241
6. Ryan TJ, Kopanitsa MV, Indersmitten T, Nithianantharajah J, Afinowi NO, Pettit C *et al.* **Evolution of GluN2A/B cytoplasmic domains diversified vertebrate synaptic plasticity and behavior.** *Nature Neuroscience.* 2013; **16**(1): 25-32. doi: 10.1038/nn.3277
7. Lai M, Brun D, Edelstein SJ, Le Novère N. **Modulation of Calmodulin Lobes by Different Targets: An Allosteric Model with Hemiconcerted Conformational Transitions.** *PLOS Computational Biology.* 2015; **11**:e1004063. doi:10.1371/journal.pcbi.1004063
8. Mattioni M, Le Novère N. **Integration of biochemical and electrical signaling-multiscale model of the medium spiny neuron of the striatum.** *PLoS One.* 2013; **8**(7): e66811. doi:10.1371/journal.pone.0066811
9. Driver JA. **Inverse association between cancer and neurodegenerative disease: review of the epidemiologic and biological evidence.** *Biogerontology.* 2014; **15**(6): 547-545. doi:10.1007/s10522-014-9523-2
10. Driver JA, Zhou XZ, Lu KP. **Pin1 dysregulation helps to explain the inverse association between cancer and Alzheimer's disease.** *Biochimica et Biophysica Acta.* 2015; pii: S0304-4165(15)00020-3. doi:10.1016/j.bbagen.2014.12.025
11. Rhinn H, Qiang L, Yamashita T, Rhee D, Zolin A, Vanti W, Abeliovich A. **Alternative α -synuclein transcript usage as a convergent mechanism in**

- Parkinson's disease pathology.** *Nature communications*. 2012; **3**:1084. doi:10.1038/ncomms2032
12. Rhinn H, Fujita R, Qiang L, Cheng R, Lee JH, Abeliovich A. **Integrative genomics identifies APOE ϵ 4 effectors in Alzheimer's disease.** *Nature*. 2013; **500(7460)**: 45–50. doi:10.1038/nature12
 13. Toga AW, Crawford KL. **The Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative informatics core: A decade in review.** *Alzheimers Dementia*. 2015; 11(7): 832-829. doi:10.1016/j.jalz.2015.04.004.
 14. Toga AW, Neu SC, Bhatt P, Crawford KL, Ashish N. The Global Alzheimer's Association Interactive Network. *Alzheimers Dementia*. 2015; pii: S1552-5260(15)02651-5. doi:10.1016/j.jalz.2015.06.1896
 15. Hossini AM, Megges M, Prigione A, Lichtner B, Toliat MR, Wruck W, Schröter F, Nuernberg P, Kroll H, Makrantonaki E, Zouboulis CC, Adjaye J. **Induced pluripotent stem cell-derived neuronal cells from a sporadic Alzheimer's disease donor as a model for investigating AD-associated gene regulatory networks.** *BMC Genomics*. 2015; **16(1)**:84. doi:10.1186/s12864-015-1262-5
 16. OECD. **Unleashing the Power of Big Data for Alzheimer's Disease and Dementia Research: Main Points of the OECD Expert Consultation on Unlocking Global Collaboration to Accelerate Innovation for Alzheimer's Disease and Dementia.** *OECD Digital Economy Papers*. 2014; No. 233, OECD Publishing. doi:10.1787/5jz73kvmvbwb-en

Article 3: Chromosome 21 large-scale yeast two-hybrid screening uncovers chromatin and synaptic complexes involved in intellectual disabilities

Dans le cadre de ma thèse, j'ai participé au projet de Julia Viard sur la physiopathologie de la Trisomie 21, aussi appelé le Syndrome de Down (Down Syndrome, DS). Ma participation a consisté en la validation de l'interaction GDI-USP25 dans la lignée cellulaire HEK293 par la technique de Proximity Ligation Assay. Ce projet fait actuellement l'objet d'une soumission au journal PNAS.

Chromosome 21 large-scale yeast two-hybrid screening uncovers chromatin and synaptic complexes involved in intellectual disabilities

Julia Viard^{1,2*}, Yann Loe-Mie^{1*}, Simon Haziza^{1,3}, Véronique Brault^{4,5,6,7,8}, Rachel Daudin¹, Malik Khelfaoui¹, Paul A. Salin⁹, Nareman Abd Elhadi¹⁰, Tal Pupko¹⁰, Christine Plancon², Charly Desobry¹, Francisco Tejedor¹¹, Richard L. Hugarir¹², Eunjoon Kim¹³, Damien Marechal^{4,5,6,7,8}, Arnaud Duchon^{4,5,6,7,8}, Makoto Kinoshita¹⁴, Guofa Liu¹⁵, Volker Haucke¹⁶, Elena Sügis¹⁷, Jaak Vilo¹⁷, Thomas Moncion¹⁸, Eugene Yu¹⁹, Valérie Hindie¹⁸, François Treussart³, Philip Gorwood¹, Jean-Christophe Rain¹⁸, Henri Bléhaut²⁰, Clotilde Mircher²⁰, Yann Herault^{4,5,6,7,8}, Michel Simonneau^{1, 3, 21**} and Aude-Marie Lepagnol-Bestel^{1**}

¹ Centre Psychiatrie & Neurosciences, INSERM U894, 75014 Paris, France

² Laboratoire de génomique fonctionnelle, CNG, CEA, Evry

³ Laboratoire Aimé Cotton, CNRS, Univ. Paris-Sud, ENS Cachan, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

⁴ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France

⁵ CNRS, UMR7104, Illkirch, France

⁶ INSERM, U964, Illkirch, France

⁷ Université de Strasbourg, Illkirch, France

⁸ PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris, ICS; GIE CERBM, CNRS, INSERM, University of Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France

⁹ UMR CNRS 5167, Lyon, France

¹⁰ George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel

¹¹ Instituto de Neurociencias CSIC-UMH, Universidad Miguel Hernandez-Campus de San Juan 03550 San Juan (Alicante), Spain

¹² Department of Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205 USA

¹³ Center for Functional Connectomics, Seoul, 136-791, Republic of Korea

¹⁴ Department of Molecular Biology, Division of Biological Science, Nagoya University Graduate School of Science, Furo, Chikusa, Nagoya, Japan

¹⁵ Department of Biological Sciences, University of Toledo, Toledo, OH, 43606, USA

¹⁶ Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) & Freie Universität Berlin, Department of Molecular Pharmacology and Cell Biology, Robert-Roessle-Straße 10, 13125 Berlin, Germany

¹⁷ Estonian Biocentre, Riia 23b, Estonia

¹⁸ Hybrigenics, 75014 Paris, France

¹⁹ Department of Cellular and Molecular Biology, Roswell Park Division of Graduate School, State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY 14263, USA

²⁰ Institut Jérôme Lejeune, 37 rue des volontaires, 75015 Paris, France

²¹ Department of Biology, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Université Paris-Saclay, 94230 Cachan, France

* Co-authors ** Senior co-authors

Correspondence: Simonneau M (michel.simonneau@inserm.fr)

Contribution

JV, YLM, SH, AD, VB, RD, MK, CP, CD, DM, MD, TM and AMLB performed research

JV, YLM, SH, NAE, AD, VB, MS and AMLB analyzed data

PAS, YH, TP, VL, VH, FT, PG, HB, CM, JCR, MS and AMLB designed research

JV, YLM, MS and AMLB wrote the paper

FT, EK, MK, TD, VH, JV, EY, RLH contributed new reagents / new analytical tools

ABSTRACT

Intellectual disability (ID) found in Down syndrome (DS), which is characterized by an extra copy of ~364 genes on chromosome 21 is poorly understood. In this study, we used two DS mouse models that either display an extra copy of the *dyrk1A* gene (189N3) or of the mouse chromosome 16 syntenic region (Dp(16)1Yey). Exome sequencing of transcripts deregulated in hippocampus and mass spectroscopy proteomics uncover enrichment in GO:0000786~nucleosome and GO:0045202~synapse, indicating a chromatin and a synaptic deregulation in each of these two models. *DYRK1A* was found to interact directly with CREBPP and EP300 in neuron nuclei. Furthermore, *DYRK1A* dosage deregulation indirectly induced changes in expression of genes encoding presynaptic proteins with a specific impairment of the non-NMDA long-term potentiation between hippocampal dentate gyrus and CA3 region. Using a large scale yeast two-hybrid screen of human brain library with human chr21 (Hsa21) baits, we identified 1,351 novel protein-protein interactions. We found that Hsa21 interactome is statistically enriched in ID gene products. Hsa21 encoded proteins (*DYRK1A*, *DSCAM*, *TIAM1*, *KCNJ6*, *HUNK*, *GRIK1* and *ITSN1*) interacted with proteins involved in synaptic plasticity (*DLG1-DLG4*, *SEPT7*, *GRIN2A/B*, *DLGAP1*, *SYNPO* and *AGAP3*) and in Late-Onset Alzheimer Disease (LOAD) (*APBA2*, *RIMBP2*, *BIN1* and *CLU*). Chr21 proteins were also found to be enriched with genes showing very strong positive selection as compared to random genes from Chr20. Together, our data uncover previously unidentified interactions of chr21 proteins with key proteins involved in synaptic plasticity, but also with proteins directly involved in ID and LOAD, emphasizing links between these diseases

INTRODUCTION

Down syndrome (DS) is the most common form of intellectual disability (ID), affecting 1/1,000 births. It is a human genetic disorder, induced by the presence of a third copy of up to ~364 genes from *Homo sapiens* chromosome 21 (Hsa21) (1). DS is one of the most complex genetic perturbations that is not lethal. In spite of a broad spectrum of clinical phenotypes, features common to all DS variants are the intellectual deficit that impairs learning and memory and an increased risk of developing a dementia very similar to Alzheimer's disease (AD) (1, 2). To date, the precise contribution of each Hsa21 protein overexpression to the cognitive impairment found in DS remains undetermined.

Here, we used three DS mouse models. The first model is a *Dyrk1A* BAC model (BAC 189N3 line) that gives a triplication of ~152 kb mouse *Dyrk1a* locus(3). The second one is a human YAC mouse model (152F7) that displays a ~570 kb human genomic region surrounding *DYRK1A* gene (4). The third model is a transgenic line (Dp(16)1Yey) consisting of a triplication of a 22.9 Mb from *Mus musculus* chr16 (Mmu16), which are syntenic to 115 genes from Hsa21 (5). *Dyrk1A* (dual-specificity tyrosine phosphorylated and regulated kinase 1A) gene was found to be a major player in DS with modifications in synaptic plasticity both in the hippocampus and in the prefrontal cortex (6, 7). *DYRK1A* is an important candidate to learning and memory impairment seen in DS patients (4) but regulatory pathways impaired by trisomy of *DYRK1A* remain elusive. In contrast, the Dp(16)1Yey model displays similar abnormal spatial memory but modifications in synaptic plasticity that are distinct from those found in the *Dyrk1A* model (5).

In this work, we examined the respective contributions of *DYRK1A* and other Hsa21 gene products in pathways linked to ID. Exome sequencing of transcripts deregulated in the hippocampus and mass spectroscopy proteomics uncover two contrasting repertoires of deregulated genes: a chromatin one for the *Dyrk1A* trisomy model and a synaptic one for the Dp(16)1Yey model. Our analyses show that *DYRK1A* interacts directly with both CREBPP and EP300 that are chromatin remodelers in neuron nuclei. Furthermore, we found that *DYRK1A* dosage deregulation indirectly induced changes in expression of genes encoding pre-synaptic proteins with a specific impairment of the NMDA-independent long-term potentiation in a precise hippocampal sub-region (Dentate Gyrus-CA3 synapses).

In order to gain further insight into the molecular network of proteins responsible for DS phenotypes, we next searched for human brain proteins that interact with proteins encoded in Hsa21. To this end, we conducted a large scale yeast two-hybrid screen using Hsa21 baits against a human brain library of targets. This analysis revealed novel interactions between Hsa21 and target proteins involved in synaptic function, thus linking DS with synaptopathies. Hsa21 genes display a particular pattern of significant positive selection as compared to random genes. Moreover, we found that Hsa21 interactome is enriched with proteins involved in ID and Late-Onset Alzheimer Disease (LOAD), suggesting a shared molecular basis that involves Hsa21 proteins in cognitive endophenotypes and dementia found in DS patients as young as 40 years old (2, 8). These results revealed previously unappreciated impact of chromosome 21 gene products on synaptic plasticity with possible consequences for ID and LOAD, emphasizing links between these diseases.

RESULTS

Hsa21 and positive selection

We investigated the evolutionary dynamics of genes encoded in chromosome Hsa21. Out of the 153 tested genes in this chromosome, 97 genes showed a statistically significant ($p < 0.05$) signal for positive selection after correcting for multiple testing. In the control group that included 120 genes from chromosome 20, positive selection was detected in 59 cases. The distributions of omega values for positively selected genes in both chromosomes is shown in **Figure 1A**. Chromosome 21 bears a heavier right tail, suggesting that it is enriched with genes showing a strong signal of positive selection (extreme high omega values). A randomization test (see methods) indicates that this difference between the chromosomes is statistically significant ($p < 0.011$). Interestingly, among the top scoring positively selected genes is Down Syndrome Critical Region 4 (DSCR4, Ensemble identifier ENSG00000184029). For this gene, 28% of the sites were associated with an omega value above 32. The complete list of top scoring positively selected genes (including the omega value for each gene, the proportion of positively selected sites and the p value) is also provided (**Supplementary Table S1**). These results suggest that Hsa21 is characterized by genes evolving by a strong positive selection in mammals. Some of these genes may be associated with DS. This link between positive selection and DS supports the notion that neurological related genes are the playground for evolutionary innovations in mammals, and at the same time, disruptions of these genes are associated with severe outcomes, as observed in neurological diseases such as DS.

Recent selective sweeps can be identified by searching for genes that display derived alleles with long haplotypes (9). Here, we searched for selective sweeps in genes encoded in Hsa21 by analyzing the recent version of the 1000G dataset (10), across three distinct populations: Africans (AFR), Asians (ASN) & Europeans (EUR). The *GRIK1* locus (centered on rs363517) displayed a long haplotype for the derived allele in AFR, compared to a background of a variety of diverse ancestral haplotypes (**Figure 1B**). Taking into account the three populations, we found 56 genes carrying at least one SNP with longer derived haplotype compared to ancestral, haplotypes including protein coding genes, long non coding RNAs and miRNAs (**Figure 1C**). According to the Human Brain Transcriptome data (11) 36 out of these 56 genes showed high expression in the striatum, hippocampus and amygdala regions at two precise developmental stages: late fetal time and adolescence time. These results strengthen the hypothesis concerning the link between genes associated with neurological functions and positive selection, focusing on recent human evolution.

Whole-genome RNA sequencing and quantitative proteomics reveal two contrasted networks of deregulated genes of hippocampus from 189N3 *DYRK1A* and Dp(16)1Yey DS models

We used the 189N3 and the Dp(16)1Yey DS mouse models. The Dp(16)1Yey model displays a triplication of 115 Hsa21 gene orthologs including *DYRK1A* (12). The Dp(16)1Yey model reflects precisely the gene dosage of Hsa21 orthologues but no genome-wide information was yet available on the deregulation of transcripts and their isoforms.

We first performed RNA sequencing on embryonic E17 hippocampi of these two DS models. We identified 84 deregulated genes in 189N3 mice (**Supplementary Table S2**) and 142 deregulated genes in Dp(16)1Yey (**Supplementary Table S3**) compared to their littermate controls. Gene ontology (GO) and gene network analyses of differentially expressed genes revealed a deregulation of chromatin proteins for 189N3 mice (**Figure 2A&C**). In contrast, Dapple analysis of Dp(16)1Yey which is a software looking for significant physical connectivity among proteins encoded for by genes in loci associated to disease according to protein-protein interactions reported in the literature (see methods), evidenced a network with statistically significance for direct edge counts ($p < 0.05$) showing that genetic variation induced by the triplication of the mmu16 affects a limited set of underlying mechanisms (**Supplementary Figure S1**). This network includes proteins involved in synaptic plasticity (NRGN, SCG2, NGEF, CAMK2A and GRIN3A), abnormal neuronal projections (EPHA8, CLSTN3) and enhanced abnormal compulsive behavior (DLGAP3). This result prompted us to analyze protein changes in adult Dp(16)1Yey hippocampi using mass spectrometry. We observed changes in GO:0045202~synapse component (**Figure 2B&C**). Interestingly, analysis of downregulated proteins gives as first significant category the same GO:0045202~synapse ($p = 7.7 \times 10^{-6}$) with SYT1, CLSTN1, RIMBP2, LIN7C, ABI1, CDK5, PPP1R9B, SLC1A2, SLC1A3, GRM2, SYN1, GRIA1, SYN2, PRKAR1A, NTRK2, CYFIP1, VAMP2, SV2A, BIN1 proteins. The upregulated repertoire for GO:0045202~synapse ($p = 0.001$) includes SCAMP1, SNAP91, GABRA1, SYNGR1, PCLO, ITPR1, LIN7A, CTNNB1, SLC32A1, GRIA2, DLG4, CYFIP2, PEBP1, SV2B, CAMK2A. Altogether, these results indicate a contrasted deregulation of chromatin-related genes for 189N3 model and synapse proteins for Dp(16)1Yey model.

Establishment of a Hsa21 protein-protein interaction map by a high-throughput, protein domain-based yeast two-hybrid (Y2H) screening

To improve our knowledge of the molecular network underlying DS, we performed a large scale protein-protein interaction study. We selected 51 human proteins based on their putative role in DS and its associated ID (see methods), and screened a highly complex random-primed adult brain cDNA library. We identified 1,351 protein-protein interactions (**Supplementary Table S4**). Although no bias is observed in the bait selection, analysis of the data suggests an enrichment of preys involved in specific molecular processes such as regulation of transcription, chromatin modification, ubiquitination and cell adhesion (**Supplementary Figure S2**).

Interaction of Hsa21DYRK1A with microRNAs processor RNASEN and FAM53C

We focused on DYRK1A interactome that is comprised of ~20 interactions previously identified (13) and 71 novel interactions identified in this study (**Supplementary Table S5**). Because we found an enrichment for chromatin-related functions among the 189N3 mice deregulated genes, we focused on DYRK1A interacting proteins involved in gene expression. For instance, we identified a new interaction between DYRK1A and RNASEN (alias DROSHA) and a second already described interaction (13) between DYRK1A and FAM53C. We validated these two interactions in primary neuron nuclei (**Supplementary Figure S3A-E**). RNASEN and DGCR8

which anchor RNASEN process miRNA transcripts into precursor miRNAs transcripts (14–16). FAM53C is a nuclear protein of unknown function. This suggests that the newly identified interaction between DYRK1A and RNASEN may affect numerous genes regulated by miRNAs. In DS, this aberrant interaction may thus have a large-scale genomic impact that needs further analyses.

Interaction of Hsa21DYRK1A with chromatin remodelers CREBBP and EP300

We next studied identified interactions between DYRK1A and EP300 or CREBBP (13). EP300 and CREBBP are the two members of the p300-CBP coactivator family and these two genes encode histone acetyltransferases (HATs) that are involved in chromatin remodeling (17). Mutations in *CREBBP* and *EP300* genes have been shown to cause Rubinstein-Taybi Syndrome (18, 19). First we found DYRK1A in immunoprecipitates of HEK293 cells using antibodies against EP300 and CREBBP (**Figure 3A-B; Supplementary Figure S3F**). We next validated direct nuclear interactions in primary cortical neurons using a proximity ligation assay (PLA) (**Figure 3C; Supplementary Figure S4A**). *Dyrk1A* gene dosage induced modifications in the number of *DYRK1A* - CREBBP and *DYRK1A* -EP300 interactions, whereas *bona fide* downstream interactions such as CREBBP -SMARCA2 and EP300-SMARCA2 were not modified (**Figure 3D; Supplementary Figures S4B**). These results identify direct chromatin interactors of DYRK1A that may participate in the REST/NRSF–SWI/SNF chromatin remodeling complex deregulation by DYRK1A that we previously reported (20).

Non-NMDA (N-methyl-D-aspartate) dependent long term potentiation at the dentate gyrus-CA3 hippocampal synapse is abolished in Dyrk1A mouse models

As *CREBBP* and *EP300* encode HATs and impact chromatin remodeling, we hypothesize that changes in number of interactions between DYRK1A and these HAT partners can consequently modify the transcription of genes involved in synaptic function (21–24). As *Dyrk1A*, *Ep300* and *Crebbp* display high levels of expression in dentate gyrus, CA1 and CA3 hippocampus sub-regions (**Figure 3E**), we analyzed synaptic plasticity at different synapses of the hippocampus and found abnormal synaptic potentiation in two mouse models of trisomy 21, BAC 189N3 and YAC 152F7. Interestingly, 152F7 mice were found to have a normal long term potentiation (LTP) in CA3-CA1 hippocampal synapses but an impaired spatial learning assessed by Morris water maze test (4). In both BAC 189N3 and YAC 152F7 models, we found that the non-NMDA dependent LTP was absent in the dentate gyrus-CA3 synapse (**Figure 3F-G**). This LTP is known to depend on molecular deregulations linked to the presynapse and is impaired in knockout mice whose *Rims1*, *Munc13-1* and *Rab3a* have been invalidated (25). Using quantitative *in situ* hybridization and RT-Q-PCR from laser-assisted micro-dissection of hippocampal sub-regions, we found that the protein levels of *Rims1*, *Munc13-1* and *Rab3a* decreased in 152F7 dentate gyrus compared to wild-type (**Figure 3H-I; Supplementary Figure S5**). Here we show that abnormal *DYRK1A* dosage can modify the expression of genes encoding proteins involved in the molecular mechanism leading to presynaptic vesicle liberation (26). These results are in full agreement with previous ones showing that abnormal *DYRK1A* dosage is able to deregulate complexes involving EP300 and CREBBP.

Interactome of Hsa21 proteins located in either dendritic spine heads or necks

As we found an enrichment for synaptic proteins in Dp(16)1Yey transgenic mouse model (**Figure 1B&C**) and as we established a Hsa21 protein-protein interaction map (**Supplementary Table S4**), we analyzed the subcellular localization by PLA of Y2H identified interactions network (**Figure 4A; Supplementary Figure S6**).

First, we identified the location of the Y2H interactions of DSCAM with DLG2 and DLG4 to be at the dendritic shafts and spines (**Figure 4B**). Then, using DSCAM bait against single DLG family members (one-by-one Y2H approach) we identified interactions between DSCAM and the four members of Discs large (DLG) family: DLG1, DLG2, DLG3, and DLG4 (**Supplementary Figure S7A**). DSCAM is known to regulate dendrite arborization and spine formation during cortical circuit development (27). DLG1 (alias SAP97), DLG2 (alias PSD93/chapsyn-110), DLG3 (alias SAP102) and DLG4 (alias PSD95/SAP90) are known to bind various proteins and signaling molecules at the postsynaptic density (PSD) (28, 29). Furthermore, mutations in *DLG2* and *DLG4* induce distinct cognitive phenotypes in both humans and mice (30). We found that DSCAM interacts with DYRK1A via a common domain shared by DSCAM. Furthermore, DYRK1A interaction was also observed with the human DSCAM ortholog (DSCAML) and with the *Drosophila melanogaster* ortholog (DSCAM4) (**Supplementary Figure S7B-E**). These results suggest that the role of this protein-protein interaction is conserved from flies to humans.

Two interesting interactions detected in the Y2H screen are between Hsa21 Intersectin (ITSN1) and both SNAP25 and DLG-Associated Protein 1 (DLGAP1 alias GKAP) (**Figure 4C**). SNAP25, is a member of the SNARE protein family, essential for the exocytosis of synaptic vesicles (26) but is also involved in trafficking of postsynaptic NMDA receptors (31) and spine morphogenesis (32). DLGAP1 is a core protein of the scaffolding complex of the synapse (33, 34). These results are in agreement with the *Itsn1* mutant mice phenotype that is characterized by severe deficits in spatial learning and contextual fear memory (35).

Another set of noteworthy interactions that we identified is between Hsa21 potassium channel KCNJ6, a voltage-insensitive potassium channel member of the kainate ionotropic Glutamate receptor (GRIK) family, and three DLG members: DLG1, DLG2 and DLG4 (**Figure 4D**). We also found an increase in the number of Kcnj6-Dlg2 interactions in the Dp(16)1Yey transgenic mouse model compared to control. In contrast, the number of Grin2ab-Dlg2 interactions did not change (**Figure 4E; Supplementary Figure S4B-C**). *KCNJ6* is expressed in dendrites and dendritic spines at the post synaptic density of excitatory synapses (36, 37) and its trisomy induces synaptic and behavioral changes (38). Intriguingly, mice lacking *Dlg2* and people with *Dlg2* mutations display abnormal cognitive abilities (30). One can propose that these phenotypic changes found in mice trisomic for Kcnj6 are generated via deregulations involving DLG2.

Hsa21 HUNK (alias MAK-V) was found in the Y2H screen to interact with GTPase-activating protein AGAP3 and actin-associated protein Synaptopodin (SYNPO) and then validated using PLA (**Figure 4F**). Agap3 was recently identified as an essential signaling component of the NMDA receptor complex that links NMDA receptor activation to AMPA receptor trafficking (39).

Synpo was localized in necks of dendritic spines and linked to the spine apparatus assuming an essential role in regulating synaptic plasticity (40, 41). These results suggest that HUNK is involved in pathways localized both near PSD95 complexes and the spine apparatus.

We next focused on protein-protein interactions of Hsa21 GRIK1. This protein is one of the kainate ionotropic glutamate receptor (GluR) subunits that function as a ligand-gated ion channel. Kainate receptors (KARs) are found ubiquitously in the central nervous system (CNS) and are present pre- and post-synaptically (42). We first identified the GRIK1-KCNQ2 interaction. As KCNQ2 potassium channels are known to functionally interact with HCN1 potassium channels in prefrontal cortex dendritic spines (43), we validated that HCN1, KCNQ2 and GRIK1 physically interact in dendritic shafts and spines using PLA and found a direct interaction between GRIK1 and HCN1 in these compartments (**Figure 4G**). We also identified and validated interactions between GRIK1 with SEPT7 and KALRN (**Figure 4H**). SEPT7, a member of the septin family of GTPases is localized to dendritic branching points and spine necks (44, 45), regulating membrane protein access to spines (46). KALRN is a Rho-GEF exclusively localized to the postsynaptic side of excitatory synapses (47, 48) and binds to NMDA receptor subunit Nr2b (49). These results indicate that GRIK1 is part of two synaptic complexes, one located near PSD95 (DLG4) at the tip of the dendritic spine and the other at the neck of spines.

Altogether, these results indicate that Hsa21 proteins are involved in distinct dendritic spine pathways located either in dendritic spine heads or in dendritic spine necks that are known to regulate compartmentalization of synapses (50).

Linking Hsa21 proteins to ID and to LOAD

We finally asked if interactions between chromosome 21 proteins and cognition disease-related gene products from the protein-protein interaction map could be validated in sub-neuronal compartments, in particular in dendritic shafts and spines. The Hsa21 USP25-GDI1 interaction was identified by Y2H (**Figure 5A and Supplementary Table S4**). *GDI1* was one of the first X-linked-gene to be identified as involved in ID (D'Amato et al., 1998) and also in autism spectrum disorders (ASD) (52, 53). We also validated Hsa21 DYRK1A-STX1A and Hsa21 HUNK-LIMK1 interaction in dendritic shafts and spines (**Figure 5B**). Both STX1A and LIMK1 are encoded by genes located on Williams-Beuren Syndrome (WBS) ~1.5Mb deletion region whose mouse model reproduces cognitive traits including hypersociability (54). More than 707 genes involved in ID have been recently identified (55). Out of these 707 ID genes, we identified 69 genes that encode either Hsa21 proteins or their direct interactors. This result indicates that the ensemble of Hsa21 proteins and their interactors tested in neurons is statistically enriched in ID genes compared to the total human Ensembl coding genes ($n=20,313$) ($X^2=19.924$, $df=1$, $p\text{-value}=8.059 \times 10^{-6}$).

Links between DS and Alzheimer-related dementia remain largely unknown, in spite of the early onset of LOAD-like dementia evidenced as early as 40 years in DS (8). Triplication of amyloid beta A4 precursor protein (APP) have been proposed to be responsible for LOAD-like dementia but increased expression of wildtype APP, even at levels in excess of those present in DS, is insufficient to cause extensive AD neuropathology (56). Interestingly, RIMBP2 that

was associated to LOAD displaying psychotic symptoms (57) is deregulated in adult mouse hippocampus (**Figure 1B**). RimBP2 is involved in the presynaptic neurotransmitter release machinery (58). Different Hsa21 products interact with proteins involved in LOAD (**Figure 5C**). Hsa21 HUNK interacts with APBA2 that is a modulator of LOAD-associated APP endocytosis and metabolism (59). Hsa21 TIAM1 interacts with BIN1 that is a risk factor identified in LOAD-GWAS studies (60). BIN1 was also identified as linked to cognition in LOAD patients (61). Furthermore, BIN1 genotype affects working memory, hippocampal volume, and functional connectivity in young healthy individuals (62). The mouse Hsa21 TIAM1 ortholog has been proposed to be responsible to synaptic abnormalities (63, 64). Here we validated Tiam1-Bin1 interactions in dendritic shafts and spines, with a similar localization for Tiam1-Dlg1 interaction (**Figure 5C; Supplementary Figure S6B**). We also observed Hsa21 DSCR9-CLU interaction (**Figure 5C**). DSCR9 and DSCR10 are found exclusively in primates such as chimpanzee, gorilla, orangutan, crab-eating monkey and African green monkey and are not present in other non-primate mammals (65) (**Supplementary Figure S8**).

Together, these results indicate that chromosome 21 proteins interact with proteins previously identified as key molecules in cognition diseases as diverse as X-linked ID, WBS, ASD and LOAD dementia.

Discussion

In spite of various mouse models of DS available, cognitive impairment phenotypes found in DS have not been related to specific alterations of molecular pathways. Furthermore, to the best of our knowledge, no specific pathways linked to synaptic alterations have been described in models overexpressing a given chr21 gene as compared to models with overexpression of a syntenic region.

In the present study, we analyzed molecular changes in hippocampus of Dyrk1A BAC (189N3) and of the transgenic mouse model that integrated the entire Hsa21 syntenic region on Mmu16, Dp(16)1Yey. We found molecular changes linked to chromatin remodeling in the 189N3 mice. Both the 189N3 as 152F7 mice that have a *DYRK1A* centered YAC fragment (4) displayed a specific impairment of non-NMDA LTP in the Dentate Gyrus-CA3 synapse. This specific cognition-related phenotype is linked to the decrease of *Rims1*, *Munc13-1* and *Rab3a* protein levels that are known to be involved in molecular machinery for neurotransmitter release (58). The related cognitive impairment appears to be rather characteristic with impaired spatial reversal learning (4, 66). In contrast, a mouse model of DS (Tc1) that carries an almost complete Hsa21 including *DYRK1A* does not have impairment in non-NMDA LTP in the Dentate Gyrus-CA3 synapse, in spite of changes in pre-synapse properties (67). Together, these results demonstrate that impairment of non-NMDA LTP in the Dentate Gyrus-CA3 synapse can be obtained only if *DYRK1A* alone is in three copies and that overexpression of other Hsa21 genes impact these molecular mechanisms. These results indicate that this particular synaptic plasticity impairment depends on *DYRK1A*-dependent chromatin remodeling involving *DYRK1A* interaction with EP300 and CREBBP. This phenotype is a novel specific synaptic readout linked to *DYRK1A* overexpression. Together, these results suggest novel drug targets not directly based on *DYRK1A* kinase but rather on downstream targets such as presynaptic components of the molecular machinery for neurotransmitter release.

In contrast, expression of an extra copy of the entire Hsa21 syntenic region on Mmu16 that spans 22.9 Mb and contains 115 Hsa21 gene orthologs including *DYRK1A* induced changes in GO neuron projection and synapse classes. Taking advantage of our Y2H resource, we identified novel interactions with protein involved in postsynaptic complexes. Hsa21 GRIK1 was found to interact with cyclic nucleotide modulated ionic channels such as KCNQ2 and HCN1 ion channels that are known to be involved in epilepsy, working and spatial memories, respectively (68–70). Hsa21 GRIK1 also interacts with SEPT7 and KALRN. SEPT7 is located specifically in the neck of dendritic spines (44), suggesting that Hsa21 GRIK1 can be part of a complex located in this sub-compartment of dendritic spines. KALRN is a GDP/GTP exchange factor regulating dendritic morphogenesis through Rac1 signaling to the actin cytoskeleton (45, 71). Signalosome complexes involving DISC1-KALRN-PSD95-RAC1 have been recently identified as able to modulate the RAC1 activity depending on the dosage of DISC1 (71). Together, our results suggest that protein-protein interactions identified here can be part of different dendritic spine signalosomes to be deregulated by three doses of Hsa21 proteins.

In conclusion, our results provide the first report, to our knowledge, of differential impacts of chromosome 21 *DYRK1A* on chromatin remodeling and of the 115 Hsa21 gene orthologs including *DYRK1A* on synapse function. Our results exemplify the link of DS with other forms of ID and with degenerative diseases displaying complex genetics such as LOAD.

The molecular pathways studied here can promote the development of novel therapeutic targets to treat cognitive impairments found in DS.

REFERENCES

1. Antonarakis SE, Lyle R, Dermitzakis ET, Reymond A, Deutsch S (2004) Chromosome 21 and down syndrome: from genomics to pathophysiology. *Nat Rev Genet* 5(10):725–738.
2. Dierssen M (2012) Down syndrome: the brain in trisomic mode. *Nat Rev Neurosci* 13(12):844–858.
3. Guedj F, et al. (2012) DYRK1A: A master regulatory protein controlling brain growth. *Neurobiol Dis* 46(1):190–203.
4. Yu T, et al. (2010) A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Hum Mol Genet* 19(14):2780–2791.
5. Ahn K-J, et al. (2006) DYRK1A BAC transgenic mice show altered synaptic plasticity with learning and memory defects. *Neurobiol Dis* 22(3):463–472.
6. Thomazeau A, et al. (2014) Prefrontal deficits in a murine model overexpressing the down syndrome candidate gene *dyrk1a*. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 34(4):1138–1147.
7. Smith DJ, et al. (1997) Functional screening of 2 Mb of human chromosome 21q22.2 in transgenic mice implicates minibrain in learning defects associated with Down syndrome. *Nat Genet* 16(1):28–36.
8. Yu T, et al. (2010) Effects of individual segmental trisomies of human chromosome 21 syntenic regions on hippocampal long-term potentiation and cognitive behaviors in mice. *Brain Res* 1366:162–171.
9. Wiseman FK, et al. (2015) A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* 16(9):564–574.
10. Sabeti PC, et al. (2002) Detecting recent positive selection in the human genome from haplotype structure. *Nature* 419(6909):832–837.
11. Sudmant PH, et al. (2015) An integrated map of structural variation in 2,504 human genomes. *Nature* 526(7571):75–81.
12. Kang HJ, et al. (2011) Spatio-temporal transcriptome of the human brain. *Nature* 478(7370):483–489.
13. Varjosalo M, et al. (2013) The protein interaction landscape of the human CMGC kinase group. *Cell Rep* 3(4):1306–1320.
14. Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ (2004) Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432(7014):231–235.
15. Han J, et al. (2006) Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* 125(5):887–901.

16. Lee Y, et al. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* 425(6956):415–419.
17. Goodman RH, Smolik S (2000) CBP/p300 in cell growth, transformation, and development. *Genes Dev* 14(13):1553–1577.
18. Bentivegna A, et al. (2006) Rubinstein-Taybi Syndrome: spectrum of CREBBP mutations in Italian patients. *BMC Med Genet* 7:77.
19. Coupry I, et al. (2002) Molecular analysis of the CBP gene in 60 patients with Rubinstein-Taybi syndrome. *J Med Genet* 39(6):415–421.
20. Lepagnol-Bestel A-M, et al. (2009) DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Hum Mol Genet* 18(8):1405–1414.
21. Alarcón JM, et al. (2004) Chromatin Acetylation, Memory, and LTP Are Impaired in CBP+/- Mice: A Model for the Cognitive Deficit in Rubinstein-Taybi Syndrome and Its Amelioration. *Neuron* 42(6):947–959.
22. Guan Z, et al. (2002) Integration of Long-Term-Memory-Related Synaptic Plasticity Involves Bidirectional Regulation of Gene Expression and Chromatin Structure. *Cell* 111(4):483–493.
23. Kandel ER (2001) The Molecular Biology of Memory Storage: A Dialogue Between Genes and Synapses. *Science* 294(5544):1030–1038.
24. Levine AA, et al. (2005) CREB-binding protein controls response to cocaine by acetylating histones at the fosB promoter in the mouse striatum. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(52):19186–19191.
25. Castillo PE (2012) Presynaptic LTP and LTD of Excitatory and Inhibitory Synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4(2). doi:10.1101/cshperspect.a005728.
26. Südhof TC, Rothman JE (2009) Membrane fusion: grappling with SNARE and SM proteins. *Science* 323(5913):474–477.
27. Maynard KR, Stein E (2012) DSCAM contributes to dendrite arborization and spine formation in the developing cerebral cortex. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 32(47):16637–16650.
28. Kim E, Sheng M (2004) PDZ domain proteins of synapses. *Nat Rev Neurosci* 5(10):771–781.
29. Sheng M, Kim E (2011) The Postsynaptic Organization of Synapses. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3(12). doi:10.1101/cshperspect.a005678.
30. Nithianantharajah J, et al. (2013) Synaptic scaffold evolution generated components of vertebrate cognitive complexity. *Nat Neurosci* 16(1):16–24.
31. Jurado S, et al. (2013) LTP requires a unique postsynaptic SNARE fusion machinery. *Neuron* 77(3):542–558.
32. Tomasoni R, et al. (2013) SNAP-25 regulates spine formation through postsynaptic binding to p140Cap. *Nat Commun* 4:2136.

33. Naisbitt S, et al. (1999) Shank, a novel family of postsynaptic density proteins that binds to the NMDA receptor/PSD-95/GKAP complex and cortactin. *Neuron* 23(3):569–582.
34. Scannevin RH, Huganir RL (2000) Postsynaptic organization and regulation of excitatory synapses. *Nat Rev Neurosci* 1(2):133–141.
35. Sengar AS, et al. (2013) Vertebrate intersectin1 is repurposed to facilitate cortical midline connectivity and higher order cognition. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 33(9):4055–4065.
36. Drake CT, Bausch SB, Milner TA, Chavkin C (1997) GIRK1 immunoreactivity is present predominantly in dendrites, dendritic spines, and somata in the CA1 region of the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(3):1007–1012.
37. Luján R, Maylie J, Adelman JP (2009) New sites of action for GIRK and SK channels. *Nat Rev Neurosci* 10(7):475–480.
38. Cooper A, et al. (2012) Trisomy of the G protein-coupled K⁺ channel gene, *Kcnj6*, affects reward mechanisms, cognitive functions, and synaptic plasticity in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(7):2642–2647.
39. Oku Y, Huganir RL (2013) AGAP3 and Arf6 Regulate Trafficking of AMPA Receptors and Synaptic Plasticity. *J Neurosci* 33(31):12586–12598.
40. Mundel P, et al. (1997) Synaptopodin: An Actin-associated Protein in Telencephalic Dendrites and Renal Podocytes. *J Cell Biol* 139(1):193–204.
41. Segal M, Vlachos A, Korkotian E (2010) The Spine Apparatus, Synaptopodin, and Dendritic Spine Plasticity. *The Neuroscientist* 16(2):125–131.
42. Lerma J, Marques JM (2013) Kainate receptors in health and disease. *Neuron* 80(2):292–311.
43. Arnsten AFT, Wang MJ, Paspalas CD (2012) Neuromodulation of thought: flexibilities and vulnerabilities in prefrontal cortical network synapses. *Neuron* 76(1):223–239.
44. Tada T, et al. (2007) Role of septin cytoskeleton in spine morphogenesis and dendrite development in neurons. *Curr Biol CB* 17(20):1752–1758.
45. Xie Y, et al. (2007) The GTP-Binding Protein Septin 7 Is Critical for Dendrite Branching and Dendritic-Spine Morphology. *Curr Biol* 17(20):1746–1751.
46. Ewers H, et al. (2014) A Septin-Dependent Diffusion Barrier at Dendritic Spine Necks. *PLoS One* 9(12):e113916.
47. Ma X-M, Huang J, Wang Y, Eipper BA, Mains RE (2003) Kalirin, a Multifunctional Rho Guanine Nucleotide Exchange Factor, Is Necessary for Maintenance of Hippocampal Pyramidal Neuron Dendrites and Dendritic Spines. *J Neurosci* 23(33):10593–10603.
48. Ma X-M, Wang Y, Ferraro F, Mains RE, Eipper BA (2008) Kalirin-7 Is an Essential Component of both Shaft and Spine Excitatory Synapses in Hippocampal Interneurons. *J Neurosci Off J Soc Neurosci* 28(3):711–724.

49. Kiraly DD, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Mains RE, Eipper BA (2011) Kalirin Binds the NR2B Subunit of the NMDA Receptor, Altering Its Synaptic Localization and Function. *J Neurosci* 31(35):12554–12565.
50. Tønnesen J, Katona G, Rózsa B, Nägerl UV (2014) Spine neck plasticity regulates compartmentalization of synapses. *Nat Neurosci* 17(5):678–685.
51. D’Amato T, Saoud M, Triboulet P, Bertaud J, Dalery J (1998) [Vulnerability to schizophrenia. I: Familial nature of of neuropsychologic indicators]. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate2.inist.fr/pubmed/9850818> [Accessed September 4, 2015].
52. O’Roak BJ, et al. (2012) Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485(7397):246–250.
53. Pinto D, et al. (2010) Functional Impact of Global Rare Copy Number Variation in Autism Spectrum Disorder. *Nature* 466(7304):368–372.
54. Li HH, et al. (2009) Induced chromosome deletions cause hypersociability and other features of Williams–Beuren syndrome in mice. *EMBO Mol Med* 1(1):50–65.
55. Vissers LELM, Gilissen C, Veltman JA (2016) Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* 17(1):9–18.
56. Balducci C, Forloni G (2011) APP transgenic mice: their use and limitations. *Neuromolecular Med* 13(2):117–137.
57. Hollingworth P, et al. (2012) Genome-wide association study of Alzheimer’s disease with psychotic symptoms. *Mol Psychiatry* 17(12):1316–1327.
58. Südhof TC (2013) Neurotransmitter Release: The Last Millisecond in the Life of a Synaptic Vesicle. *Neuron* 80(3):675–690.
59. Rhinn H, et al. (2013) Integrative genomics identifies APOE ϵ 4 effectors in Alzheimer’s disease. *Nature* 500(7460):45–50.
60. Lambert J-C, et al. (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer’s disease. *Nat Genet* 45(12):1452–1458.
61. Vivot A, et al. (2015) Association of Alzheimer’s related genotypes with cognitive decline in multiple domains: results from the Three-City Dijon study. *Mol Psychiatry* 20(10):1173–1178.
62. Zhang X, et al. (2015) Bridging Integrator 1 (BIN1) Genotype Effects on Working Memory, Hippocampal Volume, and Functional Connectivity in Young Healthy Individuals. *Neuropsychopharmacol Off Publ Am Coll Neuropsychopharmacol* 40(7):1794–1803.
63. Sala C, Segal M (2014) Dendritic Spines: The Locus of Structural and Functional Plasticity. *Physiol Rev* 94(1):141–188.
64. Toliaas KF, et al. (2005) The Rac1-GEF Tiam1 Couples the NMDA Receptor to the Activity-Dependent Development of Dendritic Arbors and Spines. *Neuron* 45(4):525–538.

65. Takamatsu K, et al. (2002) Identification of Two Novel Primate-Specific Genes in DSCR. *DNA Res* 9(3):89–97.
66. D’Adamo P, et al. (2004) Mice deficient for the synaptic vesicle protein Rab3a show impaired spatial reversal learning and increased explorative activity but none of the behavioral changes shown by mice deficient for the Rab3a regulator Gdi1. *Eur J Neurosci* 19(7):1895–1905.
67. Witton J, et al. (2015) Hippocampal circuit dysfunction in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Nat Neurosci* 18(9):1291–1298.
68. Giocomo LM, et al. (2011) Grid cells use HCN1 channels for spatial scaling. *Cell* 147(5):1159–1170.
69. Schroeder BC, Kubisch C, Stein V, Jentsch TJ (1998) Moderate loss of function of cyclic-AMP-modulated KCNQ2/KCNQ3 K⁺ channels causes epilepsy. *Nature* 396(6712):687–690.
70. Wang M, et al. (2007) Alpha2A-adrenoceptors strengthen working memory networks by inhibiting cAMP-HCN channel signaling in prefrontal cortex. *Cell* 129(2):397–410.
71. Hayashi-Takagi A, et al. (2010) Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat Neurosci* 13(3):327–332.

Acknowledgments:

This work was partly supported by Fondation Jérôme Lejeune and AgedBrainSysbio FP7.

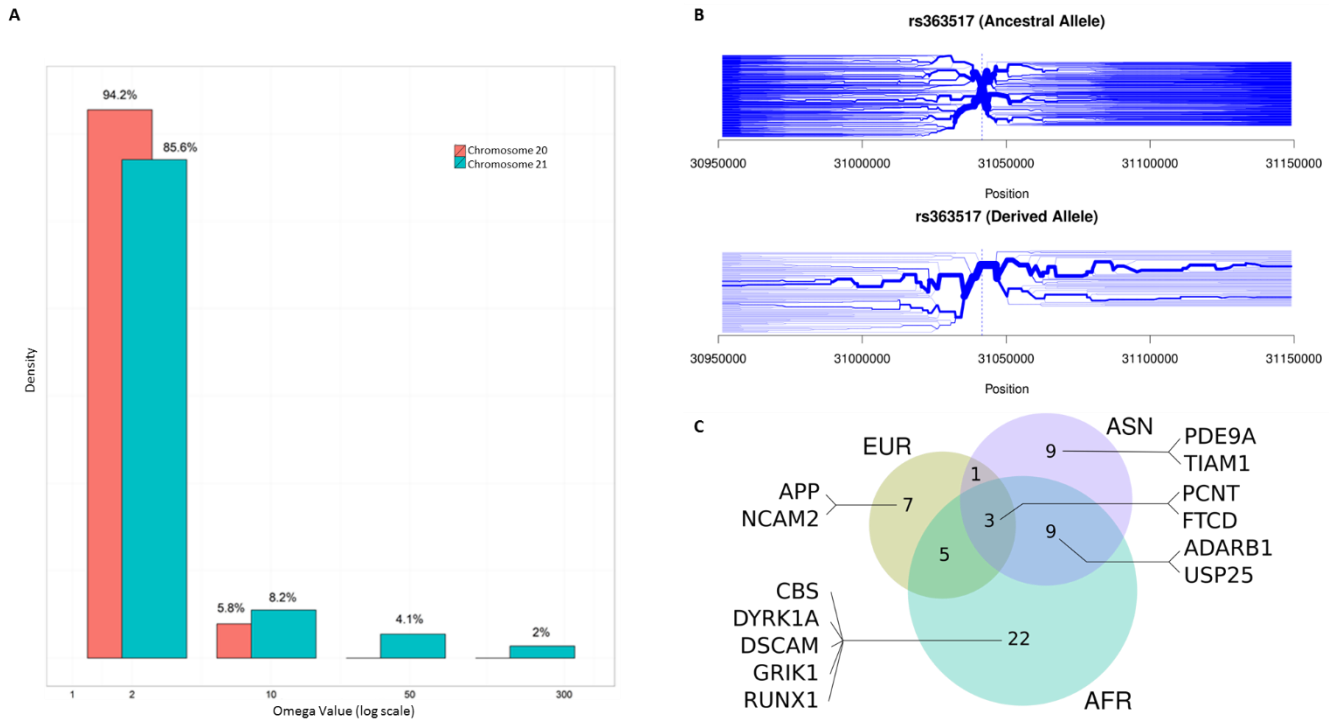


Figure 1. Analysis of selection pressure of chromosome 21

A. Histogram of number of genes in function of Omega value (K_a/K_s) for chr20 and chr21.

B. Bifurcation diagram in African population of SNP rs363517 (*GRIK1* gene locus) exhibit long haplotype of derived allele compare to ancestral allele.

C. Venn Diagram by population of number of genes carrying at least one SNP with long derived haplotype compare to ancestral allele.

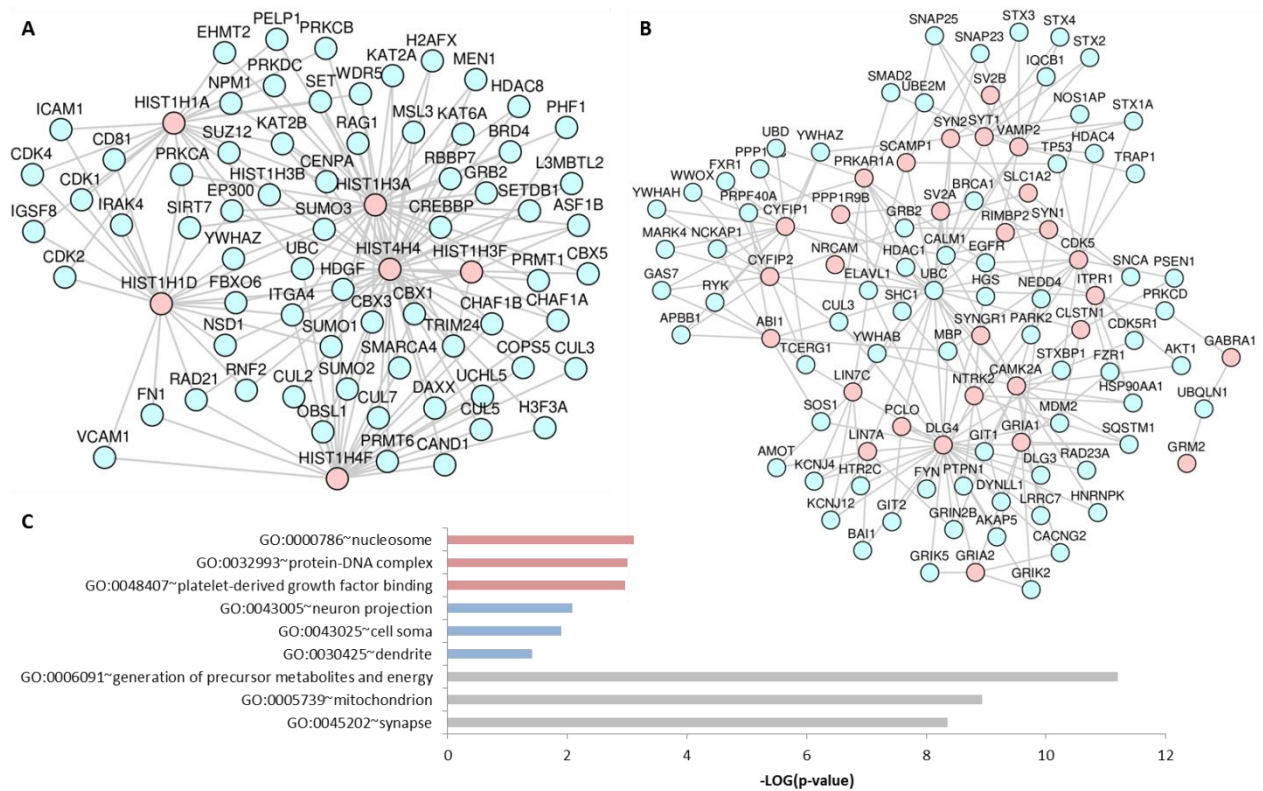


Figure 2. Whole-genome RNA and protein sequencing in 189N3 and Dp(16)1Yey transgenic mouse models

A. Schematic representation of protein-protein interactions using Cytoscape software between the products of differentially expressed genes from the RNA sequencing performed on 189N3 embryonic E17 hippocampus implied in “chromatin assembly” GO DAVID class (Red circles).

B. Schematic representation of protein-protein interactions using Cytoscape software between the differentially expressed proteins from the Mass Spectrometry sequencing performed on Dp(16)1Yey adult hippocampus implied in “synaptic transmission” GO DAVID class (Red circles).

C. GO DAVID class probabilities represented with $-\log(p\text{-value})$. Red bars represented the first three GO DAVID classes of the differentially expressed genes from the RNA sequencing performed on 189N3 embryonic E17 hippocampus. Blue bars represented the first three GO DAVID classes of the differentially expressed genes from the RNA sequencing performed on Dp(16)1Yey embryonic E17 hippocampus. Grey bars represented the first three GO DAVID classes of the differentially expressed genes from the Mass Spectrometry sequencing performed on Dp(16)1Yey adult hippocampus.

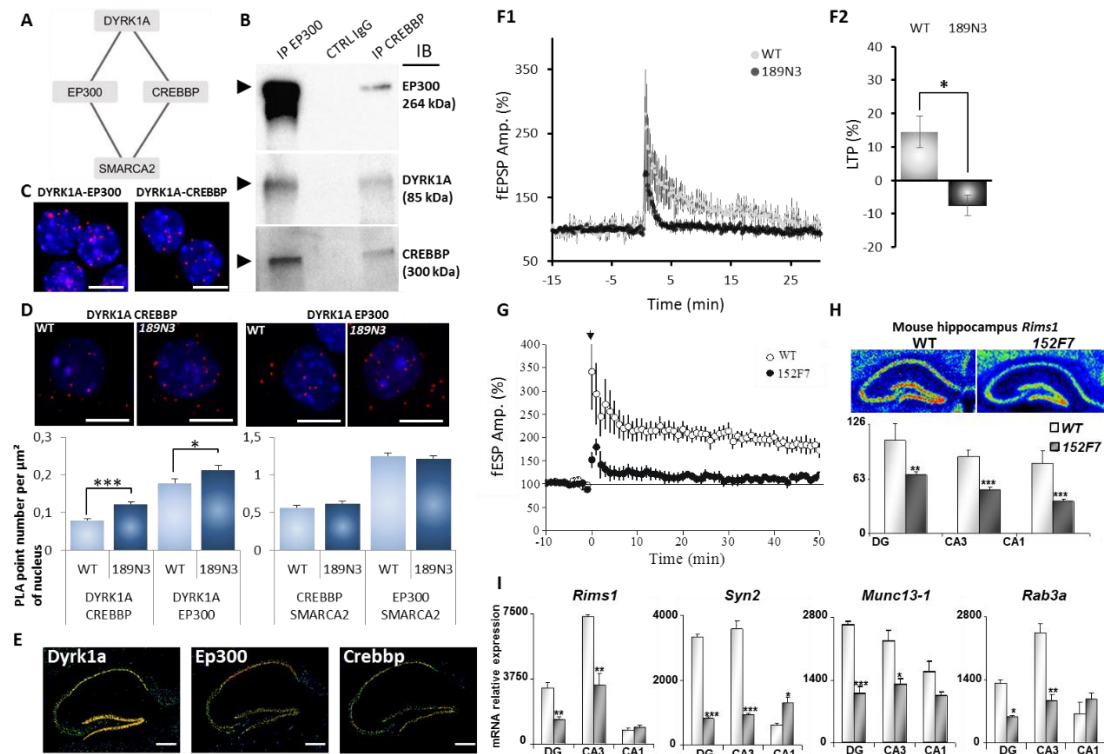


Figure 3. Deregulation of nuclear protein-protein interactions in 189N3 transgenic mouse model that potentially impact synaptic transmission and abnormal non-associative long-term potentiation (LTP) in transgenic 189N3 and 152F7 mice

A. Schematic representation (using Cytoscape software) of nuclear protein-protein interactions as inferred from yeast-two-hybrid experiments

B. Western blot quantification of EP300 and CREBBP. HEK293 cells were immunoprecipitated (IP) using anti-EP300 and anti-CREBBP antibodies and using anti-IgG antibody as a negative control. The arrows indicate protein bands at the expected size. Note that no cross-reaction was found with the IgGs.

C-D. *In situ* proximity ligation assays (PLA) on primary cortical neurons fixed at DIC7 (red fluorescence) using anti-Dyrk1a and anti-Ep300 or anti-Crebbp, anti-Smarca2 and anti-Ep300 or anti-Crebbp antibodies. Nuclear bodies were labelled using Topro3 staining (blue fluorescence). Mean interaction point numbers were calculated in nuclear body of 45 to 89 cortical neurons at DIC7 (from 3 to 5 different embryos per genotype). PLA using anti-Ep300 and anti-Fibrillarlin antibodies were performed as a negative control and no difference was shown between transgenic 189N3 and WT cortical neurons. Scale bars=10µm. * $p < 0.05$; *** $p < 0.0005$.

E. False-color image of ISH from Allen Brain Atlas showing Dyrk1a, Ep300 and Crebbp transcript expression in adult mouse hippocampus. Scale bar = 100µm.

F-G. Summary (mean±s.e.m.) of mossy fibre LTP in transgenic 189N3 compared to WT mice (F1) and in transgenic 152F7 compared to WT mice (G). Distributions for the magnitude of LTP were observed in 189N3 and WT mice (F2). Recording were performed on 4 to 6 mice in each genotypes.

H. False-color image of antisense Rims1 RNA Q-ISH of hippocampus from juvenile P21 WT and 152F7 mice. Q-ISH quantification indicates a significant down-regulation of Rims1 in the three subregions of the 152F7 mouse hippocampus.

I. Laser-assisted microdissection of the three subregions of P21 mouse hippocampus (see Supplementary Figure S5C). Rims1, Syn2, Rab3a and Munc13-1 are down regulated in the DG and CA3 hippocampal subregions of juvenile transgenic 152F7 mice compared to their WT siblings as shown by Q-RT-PCR analysis. Scale bar=1mm. * $p < 0.01$; ** $p < 0.001$; *** $p < 0.0001$

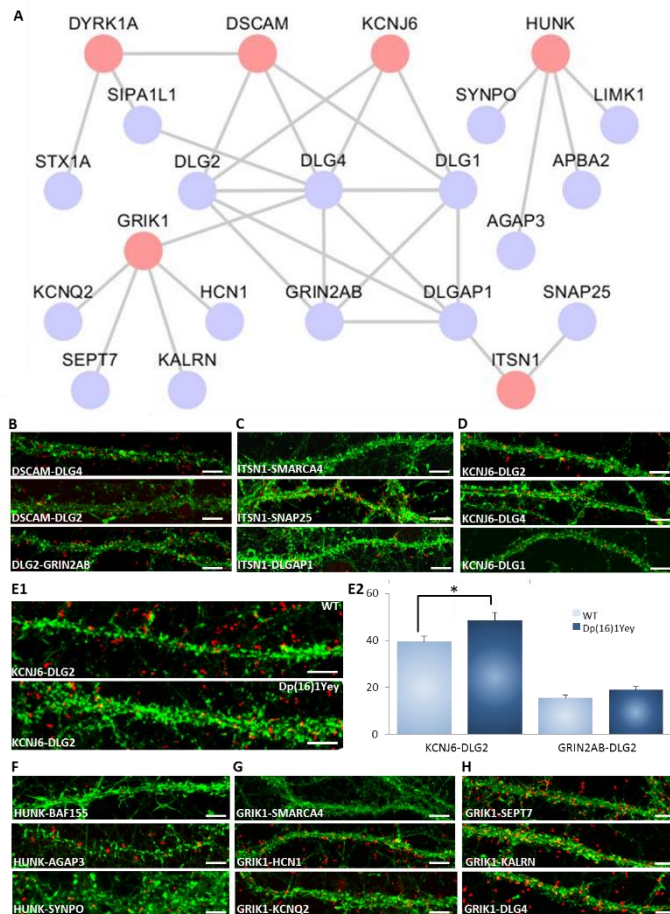


Figure 4. Synaptic protein-protein interactions and modification in Dp(16)1Yey transgenic mice.

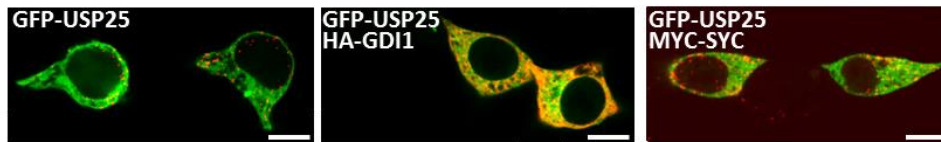
A. Schematic representation of synaptic protein-protein interactions performed by yeast-two-hybrid using Cytoscape software. Red circles correspond to genes localized on human chromosome 21.

B-H. *In situ* proximity ligation assays (PLA) on primary cortical neurons fixed at DIC21 (red fluorescence) using anti-Dscam and anti-Dlg1 or anti-Dlg2 or anti-Dlg4 antibodies (B), anti-Itsn1 and anti-Dlgap1 antibodies (C), anti-Kcnj6 and anti-Dlg2 or anti-Dlg4 antibodies (D), anti-Hunk and anti-Agap3 antibodies (F), anti-Grik1 and anti-Hcn1 or anti-Kcnq2 antibodies (G), anti-Grik1 and anti-Sept7 or anti-Kalrn antibodies (H). PLA using anti-Dlg2 and anti-Grin2ab (B), anti-Itsn1 and anti-Snap25 (C), anti-Kcnj6 and anti-Dlg1 (D), anti-Hunk and anti-Synpo (F), anti-Grik1 and anti-Dlg4 (H), were performed as positive controls. PLA using either anti-Smarca4 or anti-Baf155 antibodies are performed as negative control. Dendritic network and dendritic spines were labelled using phalloidin staining (green fluorescence). See Supplementary Figure S6 for negative controls and interaction point numbers quantifications.

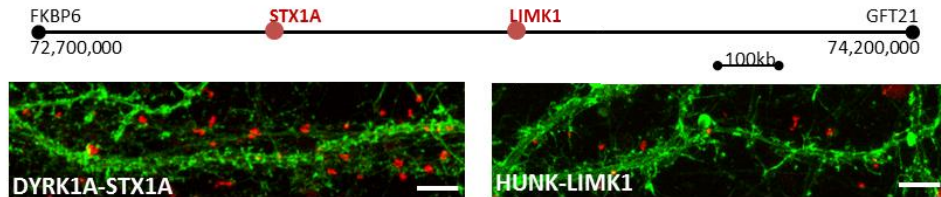
E. *In situ* PLA on transgenic Dp(16)1Yey and WT primary cortical neurons fixed at DIC21 (red fluorescence) using anti-Dlg2 and anti-Kcnj6 or anti-Grin2ab antibodies (E1). Dendritic network and dendritic spines were labelled using phalloidin staining (green fluorescence). Mean interaction point numbers (E2) were calculated in 150µm dendrites of at least 26 cortical neurons at DIC21 (from 3 different embryos per genotype). * $p < 0.05$.

Scale bars=10µm.

A X-linked Intellectual disability



B 1.5Mb Williams Beuren Syndrome deletion chromosomal region



C Late Onset Alzheimer Disease

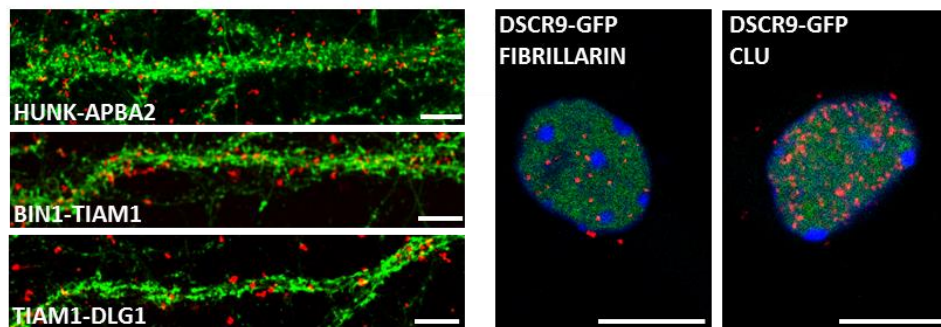


Figure 5. Synaptic protein-protein interactions involving neurodevelopmental disease-related genes.

A. Synaptic protein-protein interactions involved in X-linked Intellectual Disability (ID). *In situ* proximity ligation assays (PLA) using anti-GFP and anti-HA or anti-MYC antibodies on HEK293 co-transfected cells with GFP-USP25 and HA-GDI, GFP-USP25 and MYC-SYK as positive control, GFP-USP25 alone as negative control (red fluorescence). Green fluorescent protein was visualized on green channel.

B. Synaptic protein-protein interactions involved in Williams Beuren Syndrome (WBS). Scheme of the genetic map for the chromosomal 1.5Mb region commonly deleted in WBS (upper panel). *In situ* PLA on primary cortical neurons fixed at DIC21 (red fluorescence) using anti-Dyrk1A and anti-Stx1A antibodies or anti-Hunk and anti-Limk1 antibodies. PLA using either anti-Dyrk1A and anti-Tomm20 or anti-Hunk and anti-Baf155 antibodies were performed as a negative control. Dendritic network and dendritic spines were labelled using phalloidin staining (green fluorescence).

C. Synaptic protein-protein interactions involved in Late Onset Alzheimer Disease (LOAD). *In situ* PLA on primary cortical neurons fixed at DIC21 (red fluorescence) using anti-Hunk and anti-Apba2 or anti-Bin1 and anti-Tiam1 or anti-Dlg1 or anti-Dlg4 antibodies. PLA using anti-Tomm20 and anti-Bin1 or anti-Tiam1, anti-Hunk and anti-Baf155 were performed as negative controls. Dendritic network and dendritic spines were labelled using phalloidin staining (green fluorescence). *In situ* PLA on primary cortical neurons transfected at DIC5 and fixed 48 hours later at DIC7 (red fluorescence) using anti-GFP and anti-Clu antibodies. PLA using anti-GFP and anti-Fibrillarin antibodies were performed as a negative control. Green fluorescent protein was visualized on green channel and nuclear bodies were labelled using Topro3 (blue fluorescence). Please see Supplementary Figure S6 for negative controls and interaction point numbers quantifications. Scale bars=10µm.

Chromosome 21 large-scale yeast two-hybrid screen uncovers chromatin and synaptic complexes involved in intellectual disabilities

Julia Viard^{1,2*}, Yann Loe-Mie^{1*}, Simon Haziza^{1,3}, Véronique Brault^{4,5,6,7,8}, Rachel Daudin¹, Malik Khelfaoui¹, Paul A. Salin⁹, Nareman Abd Elhadi¹⁰, Tal Pupko¹⁰, Christine Plancon², Charly Desobry¹, Francisco Tejedor¹¹, Richard L. Hugarir¹², Eunjoon Kim¹³, Valérie Crépel¹⁴, Damien Marechal^{4,5,6,7,8}, Arnaud Duchon^{4,5,6,7,8}, Makoto Kinoshita¹⁵, Guofa Liu¹⁶, Volker Haucke¹⁷, Elena Sűgis¹⁸, Jaak Vilo¹⁸, Thomas Moncion¹⁹, Eugene Yu²⁰, Valérie Hindie¹⁹, François Treussart³, Jean-François Deleuze², Philip Gorwood¹, Jean-Christophe Rain¹⁹, Henri Bléhaut²¹, Clotilde Mircher²¹, Yann Herault^{4,5,6,7,8}, Michel Simonneau^{1, 3, 22**} and Aude-Marie Lepagnol-Bestel^{1**}

¹ Centre Psychiatrie & Neurosciences, INSERM U894, 75014 Paris, France.

² Laboratoire de génomique fonctionnelle, CNG, CEA, Evry.

³ Laboratoire Aimé Cotton, CNRS, Univ. Paris-Sud, ENS Cachan, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France.

⁴ Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Illkirch, France.

⁵ CNRS, UMR7104, Illkirch, France.

⁶ INSERM, U964, Illkirch, France.

⁷ Université de Strasbourg, Illkirch, France.

⁸ PHENOMIN, Institut Clinique de la Souris, ICS; GIE CERBM, CNRS, INSERM, University of Strasbourg, 1 rue Laurent Fries, F-67404 Illkirch-Graffenstaden, France.

⁹ UMR CNRS 5167, Lyon, France.

¹⁰ George S. Wise Faculty of Life Sciences, Tel Aviv University, Tel Aviv 69978, Israel.

¹¹ Instituto de Neurociencias CSIC-UMH, Universidad Miguel Hernandez-Campus de San Juan 03550 San Juan (Alicante), Spain.

¹² Department of Neuroscience, The Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD 21205 USA.

¹³ Center for Synaptic Brain Dysfunctions, Institute for Basic Science (IBS), Daejeon 305-701, Republic of Korea.

¹⁴ Mediterranean Institute of Neurobiology, INSERM, Marseille, France; Aix-Marseille University, Marseille, France.

¹⁵ Department of Molecular Biology, Division of Biological Science, Nagoya University Graduate School of Science, Furo, Chikusa, Nagoya, Japan.

¹⁶ Department of Biological Sciences, University of Toledo, Toledo, OH, 43606, USA.

¹⁷ Leibniz Institut für Molekulare Pharmakologie (FMP) & Freie Universität Berlin, Department of Molecular Pharmacology and Cell Biology, Robert-Roessle-Straße 10, 13125 Berlin, Germany.

¹⁸ Estonian Biocentre, Riia 23b, Estonia.

¹⁹ Hybrigenics, 75014 Paris, France.

²⁰ Department of Cellular and Molecular Biology, Roswell Park Division of Graduate School, State University of New York at Buffalo, Buffalo, NY 14263, USA.

²¹ Institut Jérôme Lejeune, 37 rue des volontaires, 75015 Paris, France.

²² Department of Biology, Ecole Normale Supérieure de Cachan, Université Paris-Saclay, 94230 Cachan, France.

* Co-authors. ** Senior co-authors. Correspondence: Simonneau M (michel.simonneau@inserm.fr).

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

Constructs

Mouse *Dyrk1a* cDNA was cloned in a *GFP* plasmid as previously described (1). Human *USP25* and *SYK* were cloned in *GFP* and *MYC* expression plasmids, respectively, as previously described (2). Human *GDI1* and *DSCR9* were amplified by PCR from IMAGE: 4156714 and IMAGE: 6065320 cDNA clones (SourceBiosciences), respectively, using the following primers:

GDI1 forward: 5'-gatcgcccgacgggccGACGAGGAATACGATGATCGTG

GDI1 reverse: 3'-gatcgccccagtgccTCACTGCTCAGCTTCTCCAAAGACGTC

DSCR9 forward: 5'-gatcgcccgacgggccATGGGCAGGATTTGCCCGTGAAC

DSCR9 reverse: 3'-gatcgccccagtgccTCACCATAATTCCTGTGTCTGAATCTGAA

The *Sfi*I digestion products of the amplicons were inserted into the multiple cloning site of the HA and GFP expression vectors under control of the CMV promoter.

Transfection of primary cell cultures

Cortical primary neurons were transfected at DIC5 using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), as described by the manufacturer. Cells were analyzed 48 hours after transfection at DIC7.

HEK293 cell cultures and transfection

HEK293 cells were plated in 24-well plates in DMEM (Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum and cultured at 37°C with 5% CO₂. At 70% confluency, the cells were transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen), as described by the manufacturer. Co-transfections were performed at 1:3 ratio. Cells were analyzed 48 hours after transfection.

Quantitative *In situ* hybridization (ISH)

For *Rim1 in situ* hybridization, a 1124 bp *Rim1* PCR product (covering nucleotides 376 to 1499 of the XM_129709 cDNA sequence) was inserted into a pCRII-TOPO cloning vector) as previously described (1). *Xho*I- or *Hind*III-linearized *Rim1* inserts were used to generate antisense or sense [³⁵S]-rUTP (800 Ci/mmol, Amersham) labeled transcripts, using the P1460 riboprobe *in vitro* transcription systems (Promega), according to the manufacturer's instructions. Paraffin-embedded coronal 15 μm sections of P21 mouse brains, including hippocampal structures, were selected for ISH. Sections were hybridized with radiolabeled RNA probe (diluted to 105 cpm/μl in 50% formamide hybridization buffer) in 50% formamide at 50°C. Sections were successively washed in 50% formamide, 2 x SSC, 10 mM DTT at 65°C, and then in increasingly stringent SSC washing solution, with a final wash at 0.1 x SSC at 37°C. The regional distribution of radioactivity was analyzed in the hippocampal region of wild-type and transgenic sections using a digital autoradiography imager (Micro Imager from Biospace, Institut Pasteur, Paris, France) and its analysis program (Betavision Biospace).

Laser-assisted microdissection, total RNA preparation and quantitative real-time PCR (Q-RT-PCR) analysis

Embryonic brain sub-regions were dissected as shown in Supplementary Figure S5. The left and right hippocampus were microdissected from genotyped P21 mouse brains using a laser-assisted capture microscope (Leica ASLMD instrument) with Leica polyethylene naphthalate membrane slides as previously described (1). RNA preparation and Q-RT-PCR are performed as previously described (1). Q-RT-PCR results are expressed in arbitrary units.

Protein extraction and Western blot analysis.

HEK293 cells or mouse cortex (pool from three adult OF1 mice) were homogenized on ice in Tris-buffered saline (100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP40, 1 x CIP). The homogenates were centrifuged at 13,000g for 10 min at 4°C and the supernatants were stored at -80 °C. Cell lysate protein concentration was determined using the BCA Protein assay kit (ThermoFisher). For SDS-PAGE, 40µg of protein was diluted in Laemmli 1x (BioRad) with DTT and incubated for 5mn at 95°C. Protein samples were loaded in each lane of a 4-15% precast polyacrylamide gel (BioRad) and ran in Mini-Protean at 200 V in Tris/Glycine running buffer (BioRad). Following SDS-PAGE, proteins were semi-dry electro-blotted onto nitrocellulose membranes using the Trans-Blot Turbo Transfer System (BioRad). Membranes were incubated for 1 h at room temperature in blocking solution (PBS 1x containing 5% non-fat dried milk, 0.05% Tween 20) and then overnight at 4°C with the primary antibody. Primary antibodies used are shown in Supplementary Table S5. Membranes were washed in PBS 1x containing 0.05% tween 20 and incubated for 1 h at room temperature with anti-mouse, anti-rabbit or anti-goat HRP-conjugated secondary antibody. Membranes were washed three times in PBS 1x containing 0.05% tween 20 and incubated in Clarity Western ECL Substrate (BioRad), according to the manufacturer's instructions. Chemiluminescence was detected using the ChemiDoc XRS Imaging System (BioRad).

Immunoprecipitation

One mg of protein extracts were incubated, after pre-clear with 50µL of dynabeads (Novex), for 3h at 4°C while rotation with 10 µg of primary antibody (Supplementary Table S5; anti-mouse and anti-rabbit whole IgG (Millipore 12-371 and 12-370 respectively). Fifty µL of protein A or protein G dynabeads were added and the samples were incubated for 30min at 4°C while rotating. Protein-antibody complexes were washed four times in 100 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 1% NP40 and analyzed by immunoblot.

Electrophysiological analysis of 152F7 juvenile mice

The methods used have been described elsewhere (Hanson et al., 2007). Briefly, for the preparation of hippocampal slices, P21 mice were deeply anaesthetized with Nembutal. Brain slices (300-400µm) were cut in cold (temperature ~4-8°C) artificial cerebrospinal fluid (ACSF) contained 124mM NaCl, 26mM NaHCO₃, 2.5 mM KCl, 1.25 mM NaH₂PO₄, 2.5 mM CaCl₂, 1.3 mM MgCl₂, and 10 mM glucose. Slices were maintained at room temperature for at least 1 hour in a submerged chamber containing ACSF equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂ and were then transferred to a superfusion chamber. Field excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) were recorded, using microelectrodes (1–3 MΩ) filled with ACSF, at 22° to 25°C. Bipolar stainless steel electrodes were used for the electrical stimulation of Schaffer collaterals and mossy fibers (0.1 ms, 10 to 100 µA pulses, intertrial intervals of 10 to 30 s). Field EPSP recordings of mossy fibers and Schaffer collaterals were taken using a DAM80 amplifier (WPI),

under visual control, with an upright microscope (BX50WI, Olympus). Mossy fiber long term potentiation (LTP) was induced by tetanus at 25 Hz for 5 s, in the presence of 50 μ M D-AP5 (D (-) 2-amino-5-phosphonovaleric acid). Mossy fiber responses were identified in wild-type and 152F7 mice using the group 2-metabotropic glutamate receptor selective agonist DCG IV. The inhibitory effects of DCG IV (10 μ M) on mossy fiber inputs were similar in mutant and wild-type mice. NBQX (5 μ M) was applied at the end of each mossy fiber experiment, to assess the amplitude of fiber volleys. For Schaffer collateral LTP, stimulating and extracellular recording electrodes were placed in the *stratum radiatum* and the GABA-A receptor antagonist picrotoxin (100 μ M) was added to the ACSF. In this series of experiments, the CA1 region was separated from the CA3 region by sectioning the brain slice with a knife before recording. Data were acquired and analyzed blind to genotype for LTP experiments. On- and offline data analyses were carried out with Acquis1-EIPhy software (developed by G. Sadoc, UNIC CNRS and ANVAR, France). Summary data are expressed as means \pm SEM. The following drugs were used: NBQX, D-APV, DCGIV (Tocris) and picrotoxin (Sigma).

Electrophysiological analysis of 189N3 adult mice

Preparation of hippocampal slices. Mice were deeply anesthetized with xylazine 13 mg/kg / ketamine 66 mg/kg and transcardially perfused with a modified ACSF(mACSF) containing 132mM choline, 2.5mM KCl, 1.25mM NaH₂PO₄, 25mM NaHCO₃, 7mM MgCl₂, 0.5mM CaCl₂, and 8mM D-glucose prior to decapitation. The brain was then rapidly removed, the hippocampi were dissected, and transverse 450 μ M thick slices were cut using a Leica VT1200S vibratome in ice-cold oxygenated (95% O₂ and 5% CO₂) mACSF. Slices recovered at room temperature for at least 1 h in ACSF containing 126mM NaCl, 3.5mM KCl, 1.25mM NaH₂PO₄, 26mM NaHCO₃, 1.3mM MgCl₂, 2mM CaCl₂, and 10mM D-glucose. Both cutting solution and ACSF were between 290 mOsm and 310 mOsm. All solutions were equilibrated with 95% O₂ and 5% CO₂, pH 7.4.

Field excitatory postsynaptic potential (fEPSP) recordings. Acute slices were individually transferred to a recording chamber maintained at 30–32°C and continuously perfused (2 ml/min) with oxygenated ACSF. fEPSP were induced in the *lucidum* of CA3 area with glass electrodes (2–3 M Ω ; filled with normal ACSF) using a DAM-80 amplifier (low filter, 1 Hz; highpass filter, 3 KHz; World Precision Instruments, Sarasota, FL). Mossy fiber-mediated fEPSP were evoked by weak electrical stimulations performed via a bipolar NiCh electrode (NI-0.7F, Phymep, Paris) positioned in the *lucidum* of CA3 area. The stimulus intensity, pulse duration, and frequency were around 30V, 25 μ s, and 0.1 Hz, respectively. Data were digitized to a PC using a Digidata 1440A (Molecular Devices), and acquired using the Clampex 10.1 software (PClamp, Molecular Devices). Signals were analyzed off-line using Clampfit 10.1 (Molecular Devices). LTP was induced by tetanus at 25Hz for 5s; D-APV (D-2-amino-5-phosphonovalerate, 40 μ M) was included in ACSF during the tetanus to eliminate contamination of MF-CA3 LTP with an NMDA receptor-dependent component. At the end of each experiment, 2 μ M DCG-IV, a group II mGluR agonist, was bath applied to confirm the mossy fiber synaptic origin of fEPSP recorded in CA3. The magnitude of long-term plasticity was determined by comparing baseline-averaged responses before induction to the last 10 min of the experiment. Example traces are averages of at least 30 consecutive sweeps taken from a single representative experiment.

Statistical analysis. All data are shown as means \pm -SEM. Statistical analyses were performed using IgorPro (Wavemetrics), and statistical significance was determined by the Student's t test (two tailed distribution, paired) unless otherwise stated.

Reagents. Stock solutions were prepared in water or DMSO, according to the manufacturers' recommendation, and stored at -20°C. Upon experimentation, reagents were bath applied following dilution into ACSF (1/1000). D-APV and DCGIV were purchased from Tocris Bioscience. Salts for making the cutting solution and ACSF were purchased from Sigma.

Mass spectrometry analysis.

Fourty microgram of total hippocampi protein extracts (n=5 per genotype) were used for the preparation. Samples were precipitated, reduced, alkylated and digested overnight with LysC and trypsin at 37°C. Ten μ g of each sample were then labeled with TMT isobaric tags, pooled, desalted on a C18 spin-column and dried on a speed-vacuum before nanoLC-MS/MS analysis. Samples were separated on a C18 Accucore nano-column (75 μ m ID x50 cm, 2.6 μ m, 150 Å, Thermo Fisher Scientific) coupled in line with an Orbitrap ELITE mass spectrometer (Thermo Scientific, San Jose, California). Samples were analyzed in a Top15 HCD (High Collision Dissociation) mass spectrometry on 8h gradient. Data were processed by database searching using SequestHT (Thermo Fisher Scientific) with the Proteome Discoverer 1.4 software (Thermo Fisher Scientific) against a mouse Swissprot database (release 2015-03). Peptides were filtered at 5% false discovery rate (FDR) and one peptide in rank 1. Protein quantitation (ratio of the intensity of the fragmented tag in sample "x" to the intensity of the fragmented tag in one WT sample used as the reference (ref)) was performed with reporter ions quantifier node in the Proteome Discoverer 1.4 software with integration tolerance of 20 ppm, and the purity correction factor was applied according to the manufacturer's instructions. Data were filtered using the following criteria: minimum number of peptide ratios used to calculate the protein ratio equals to 2; variability of the peptide ratios <40%; ratio Dp(16)1Yey samples $x > 1.2$ or $x < 0.8$ and ratio WT samples $0.8 < x < 1.2$.

Long Haplotypes Method

Data from 1000G phase 3 was used (3), as well as ancestral information provided by the 1000G consortium. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) were filtered with minor allele frequency (MAF) below 1%. This analysis was performed on three populations, namely African (AFR), Asian (ASN) and European (EUR). Using the R package rehh (4), integrated Haplotype Homozygosity (iHS) was calculated for all biallelic variants on Hsa21 and with known ancestral state. These scores were standardized within the chromosome according to the frequency of the derived allele keeping the first 1/1000 quantile (negative iES scores, i.e haplotype carrying derived allele, is longer than the one carrying ancestral allele). Selected genes in a population were reported if at least one SNP fell in the transcribed region of the gene. Bifurcation diagram was draw using the R package rehh (4).

Bioinformatics analysis tools

Cytoscape Networks Protein-protein interaction networks were generated using the Cytoscape software (<http://cytoscape.org>).

Gene Ontology Analysis The function of genes was analyzed and annotated according to the three organizing principles of Gene Ontology (GO) classes (<http://www.geneontology.org>; BP: Biological Process, MF: Molecular Function, CC: Cellular Component). GO analyses were investigated using either The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID), an online tool providing a module-centric approach for functional categories and biological processes which are most represented within a large gene list (5, 6) or g:Profiler, a public web server for characterizing and manipulating gene lists of high-throughput genomics (7, 8).

Phenotype network The NETwork-Based Analysis of Genomic variations (NETBAG) algorithm finds relationships between genes by searching for cohesive clusters of genes perturbed by disease-associated genetic variations (9, 10). Candidate networks are assigned a score based on a weighted sum of their edges, representing the likelihood that the respective genes participate in the same genetic phenotype. The likelihood contains a naive Bayesian integration of various protein-function descriptors: shared annotations in Gene Ontology (GO), Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), protein domains from the InterPro database, tissue expression from the TiGER database; direct protein-protein interactions, or shared interaction partners in a number of databases (BIND, BioGRID, DIP, HPRD, InNetDB, IntAct, BiGG, MINT and MIPS); phylogenetic profiles and chromosomal co-clustering across genomes. Network significance is then determined by comparing this score to a distribution of scores obtained by applying the same search algorithm to sets of random genes.

Protein-protein link evaluation Disease Association Protein-Protein Link Evaluator (DAPPLE) looks for significant physical connectivity among proteins encoded by genes in loci associated to disease according to protein-protein interactions reported in the literature (11). Interactions are extracted from the database “InWeb” that combines data from a variety of public PPI sources including MINT, BIND, IntAct and KEGG and define high confidence interactions as those observed in multiple independent experiments. Connections can be either direct (two proteins are physically linked to each other) and indirect (interaction is mediated by a common interactor). The non-randomness of the network and the significance of the interaction parameters are tested using a permutation method that compares the original network with thousands of networks created by randomly re-assigning the protein names while keeping the overall structure (size and number of interactions) of the original network.

Bioinformatics evolutionary analysis

Orthologs collection, multiple sequence alignments, and phylogenetic trees A list of 693 genes from Hsa21 was examined. For each gene, orthologs across mammals were collected from Ensembl version 82 (12). During this process, the longest coding transcript for each human gene was first obtained. One-to-one orthologs in all mammals were sought, and for each such ortholog, the coding transcript with the best global pairwise score against the human transcript (13) was selected. 153 genes, for which at least one mammalian ortholog was detected, were retained. As a control the same procedure was repeated on 200 randomly selected genes from chromosome 20. Orthologs were found for 120 genes. For each of the orthologous groups, a multiple sequence alignment was computed using MAFFT version v7.182 (14). A species tree topology for all mammals was based on current literature (15–18). For each gene, this topology was trimmed to obtain a species topology, representing only the mammalian species in the group of orthologs obtained for this gene.

Detecting positive selection Positive selection in each gene was searched by running PAML version 4.8 (19), contrasting a model that allows for positive selection (the M8) against a model which does not allow for positive selection (M8a) (20, 21). As these models are nested, a likelihood ratio test was performed between them while correcting for multiple testing to control for the false positive rate (22). In order to test whether genes showing a strong signal of positive selection in Hsa21 are characterized with higher values of omega when compared to control genes in Hsa20, the following randomization test was performed. D21 was defined to be the omega value corresponding to the top 5% of positively selected genes in Hsa21. D20 was similarly computed based on Hsa20 genes, and a test statistic D was defined as the difference between D21 and D20. The null hypothesis was that there was no difference in the omega values of top scoring genes between Hsa21 and Hsa20, and it was thus tested whether D significantly deviates from zero. To this end, a null distribution for D was computed by generating a collection of 100,000 random assignments of the genes into two groups (each of the groups was of the original size of the chromosome gene groups) and computing a random statistic D^* from each such random assignment. The p value was empirically computed by comparing D to the null distribution of D^* values.

A file with the multiple sequence alignments for each gene and its phylogenetic tree is provided as supplementary material.

Yeast-two-hybrid experiments

Orthologs collection, multiple sequence alignments, and phylogenetic trees A list of 693 genes from Hsa21 was examined. For each gene, orthologs across mammals were

Preparation of bait constructs The coding sequence for each bait protein (Supplementary Table S3) was PCR-amplified and cloned in-frame with the LexA DNA binding domain (DBD) into plasmid pB27, derived from the original pBTM116 (23). DBD constructs were checked by sequencing the entire insert. Several inserts were cloned in-frame with the Gal4 DBD into plasmid pB66, derived from pAS2 $\Delta\Delta$ (24). For DSCR8 (contested coding gene) cDNA coding for

MKEPGPNFVTVRKGLHSFKMAFVKHLLLFLSPRLECSGSITDHCSLHLPVQEILMSQPPEQL
GLQTNLGNQESSGMMKLFMPRPKVLAQYESIQFMP have been used.

Preparation of Dyrk1a Δ polyHis mutant bait construct The sequence coding for Dyrk1a C-terminus (aa 600-763) was modified to remove the poly-Histidine stretch to prevent potential artefacts of binding with Cysteine-rich prey proteins without altering the folding of the bait. This region was modified by genesynthesis (Eurofins-Genomics) inserted in the cDNA cloned resulting in the sequence behind: DYRK1A delta polyHis:
PQQNALHAAHGNSSAAAGAHAGAAHAHGQQALGNRTRP

Preparation of prey constructs 1-by1 assays DLG1 (aa 305-653), DLG4 (154-356), DLG2-5 (aa 84-440) prey plasmids were extracted from the diploid cells obtained from the Y2H screening with wild-type DSCAM of the Human Adult Brain library. Inserts are cloned in-frame with the Gal4 activation domain (AD) into plasmid pP6, derived from the original pGADGH (25). The coding sequence for DLG3 (aa 212-385) was PCR-amplified and cloned in-frame with the Gal4 AD into plasmid pP7. The AD constructs were checked by sequencing.

Y2H Screening and 1by1 interaction assays Bait and prey constructs were transformed in the yeast haploid cells, respectively CG1945 or L40ΔGal4 (mata) and YHGX13 (Y187 ade2-101::loxP-kanMX-loxP, mata) strains. The diploid yeast cells were obtained using a mating protocol with both yeast strains (24). His⁺ colonies were selected on a medium lacking tryptophan, leucine and histidine, and supplemented with 3-aminotriazole to handle bait autoactivation when necessary. The prey fragments of the positive clones were amplified by PCR and sequenced at their 5' and 3' junctions. The resulting sequences were used to identify the corresponding interacting proteins in the GenBank database (NCBI) using a fully automated procedure. A confidence score (PBS, for Predicted Biological Score) was attributed to each interaction as previously described (26).

1-by-1 Y2H interaction assays Interaction pairs were tested in duplicate as two independent clones from each diploid were picked for the growth assay. For each interaction, several dilutions (10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ and 10⁻⁴) of the diploid yeast cells (culture normalized at 5×10⁴ cells) and expressing both bait and prey constructs were spotted on several selective media. The DO-2 selective medium lacking tryptophan and leucine was used as a growth control and to verify the presence of both the bait and prey plasmids. The different dilutions were also spotted on a selective medium without tryptophan, leucine and histidine (DO-3). Four different concentrations of 3-AT, an inhibitor of the HIS3 gene product, were added to the DO-3 plates to increase stringency. The following 3-AT concentrations were tested: 1, 5, 10 and 50 mM.

REFERENCES

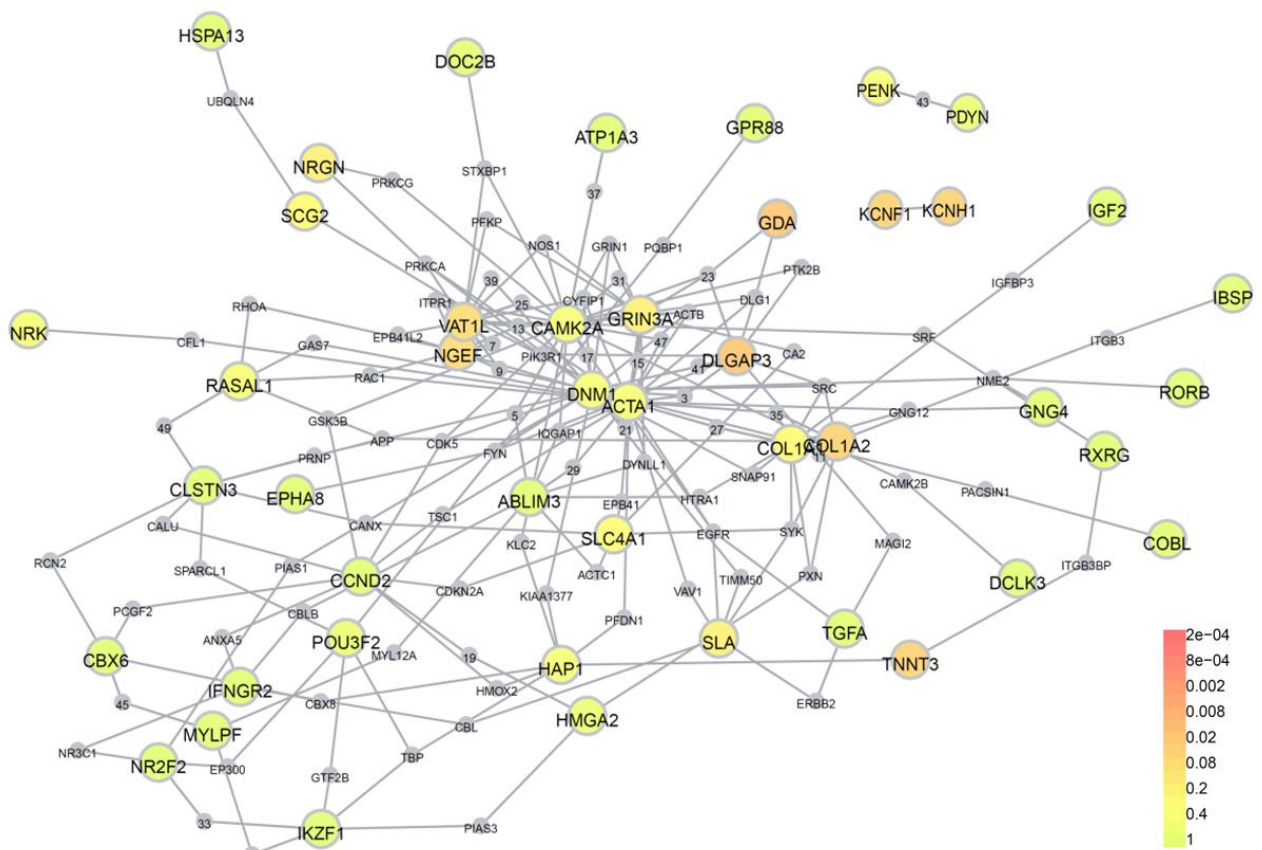
1. Lepagnol-Bestel A-M, et al. (2009) DYRK1A interacts with the REST/NRSF-SWI/SNF chromatin remodelling complex to deregulate gene clusters involved in the neuronal phenotypic traits of Down syndrome. *Hum Mol Genet* 18(8):1405–1414.
2. Cholay M, Reverdy C, Benarous R, Colland F, Daviet L (2010) Functional interaction between the ubiquitin-specific protease 25 and the SYK tyrosine kinase. *Exp Cell Res* 316(4):667–675.
3. The 1000 Genomes Project Consortium (2012) An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature* 491(7422):56–65.
4. Gautier M, Vitalis R (2012) rehh: an R package to detect footprints of selection in genome-wide SNP data from haplotype structure. *Bioinforma Oxf Engl* 28(8):1176–1177.
5. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat Protoc* 4(1):44–57.
6. Huang DW, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37(1):1–13.
7. Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J (2007) g:Profiler--a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Res* 35(Web Server issue):W193–200.
8. Reimand J, Arak T, Vilo J (2011) g:Profiler--a web server for functional interpretation of gene lists (2011 update). *Nucleic Acids Res* 39(Web Server issue):W307–315.

9. Gilman SR, et al. (2012) Diverse types of genetic variation converge on functional gene networks involved in schizophrenia. *Nat Neurosci* 15(12):1723–1728.
10. Chen L, Vitkup D (2006) Predicting genes for orphan metabolic activities using phylogenetic profiles. *Genome Biol* 7(2):R17.
11. Rossin EJ, et al. (2011) Proteins encoded in genomic regions associated with immune-mediated disease physically interact and suggest underlying biology. *PLoS Genet* 7(1):e1001273.
12. Kersey PJ, et al. (2012) Ensembl Genomes: an integrative resource for genome-scale data from non-vertebrate species. *Nucleic Acids Res* 40(Database issue):D91–97.
13. Needleman SB, Wunsch CD (1970) A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins. *J Mol Biol* 48(3):443–453.
14. Katoh K, Standley DM (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol Biol Evol* 30(4):772–780.
15. Blanga-Kanfi S, et al. (2009) Rodent phylogeny revised: analysis of six nuclear genes from all major rodent clades. *BMC Evol Biol* 9:71.
16. Nyakatura K, Bininda-Emonds ORP (2012) Updating the evolutionary history of Carnivora (Mammalia): a new species-level supertree complete with divergence time estimates. *BMC Biol* 10:12.
17. Perelman P, et al. (2011) A molecular phylogeny of living primates. *PLoS Genet* 7(3):e1001342.
18. Song S, Liu L, Edwards SV, Wu S (2012) Resolving conflict in eutherian mammal phylogeny using phylogenomics and the multispecies coalescent model. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(37):14942–14947.
19. Yang Z (1997) PAML: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Comput Appl Biosci CABIOS* 13(5):555–556.
20. Swanson WJ, Nielsen R, Yang Q (2003) Pervasive adaptive evolution in mammalian fertilization proteins. *Mol Biol Evol* 20(1):18–20.
21. Yang Z (2000) Maximum likelihood estimation on large phylogenies and analysis of adaptive evolution in human influenza virus A. *J Mol Evol* 51(5):423–432.
22. Benjamini Y, Hochberg Y (1995) Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing. *J R Stat Soc Ser B Methodol* 57(1):289–300.
23. Vojtek AB, Hollenberg SM (1995) Ras-Raf interaction: two-hybrid analysis. *Methods Enzymol* 255:331–342.
24. Fromont-Racine M, Rain JC, Legrain P (1997) Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet* 16(3):277–282.

25. Bartel PL, Chien CT, Sternglanz R, Fields S (1993) Using the two-hybrid system to detect protein-protein interactions. In *Cellular Interactions in Development: A Practical Approach*, D. A. Hartley, Ed., Oxford University Press, Oxford; pp 153-179.

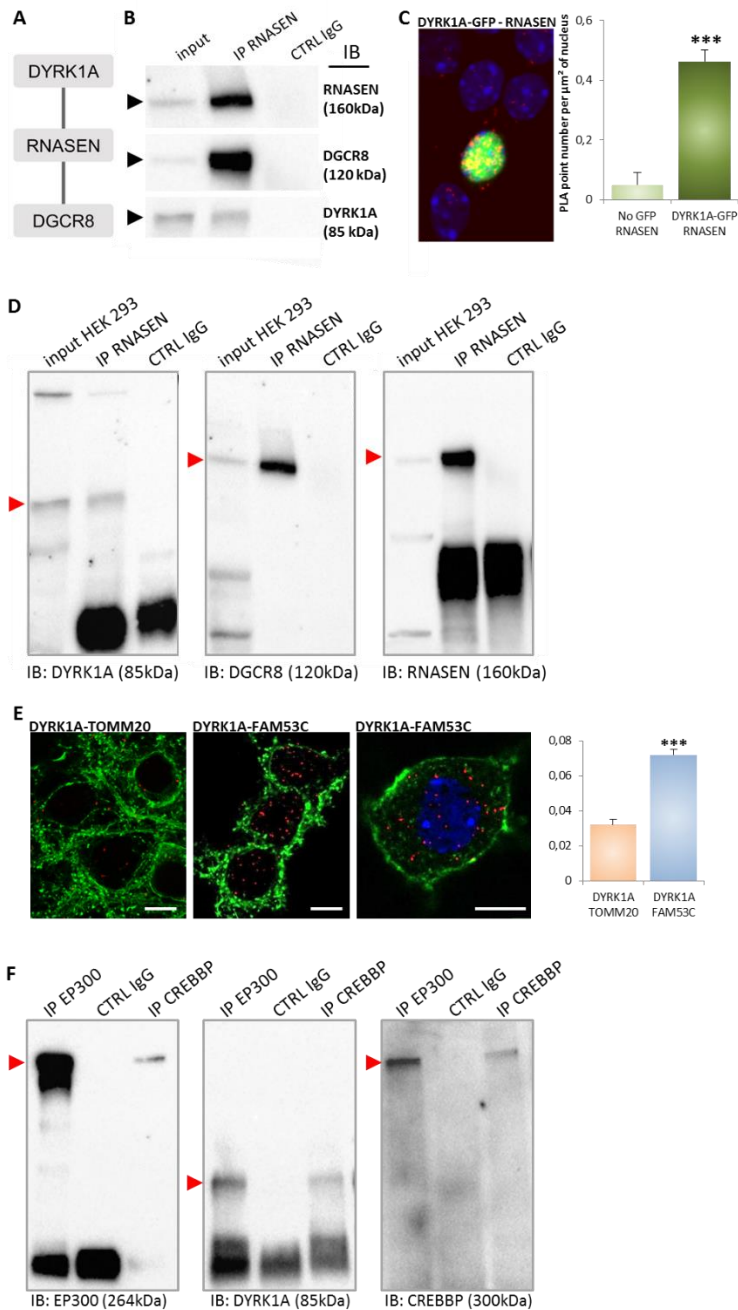
26. Formstecher E, et al. (2005) Protein interaction mapping: a Drosophila case study. *Genome Res* 15(3):376-384.

SUPPLEMENTARY LEGENDS



Supplementary Figure S1. Whole-genome RNA sequencing in Dp(16)1Yey transgenic mouse model.

Dapple network of the 142 differentially expressed genes, as identified via RNA sequencing performed on Dp(16)1Yey embryonic E17 hippocampus.



Supplementary Figure S2. Nuclear protein-protein interactions

A. Schematic representation, generated using the Cytoscape software, of nuclear protein-protein interactions, as identified by yeast-two-hybrid

B. Protein extracts of HEK293 cells were immunoprecipitated (IP) using anti-RNASEN antibody or anti-IgG antibody as a negative control. The input and precipitated fractions were then analyzed by Western blot using anti- RNASEN, anti-Dgcr8 and anti-Dyrk1a antibodies. The arrows indicate protein bands at the expected size. Note that no cross-reaction was found with the IgGs.

C. *In situ* proximity ligation assays (PLA) on primary cortical neurons transfected at DIC5 with Dyk1a-GFP construct (green fluorescence) and fixed at DIC7, using anti-GFP and anti-RNASEN antibodies (red fluorescence). Non-transfected neurons were used as a negative

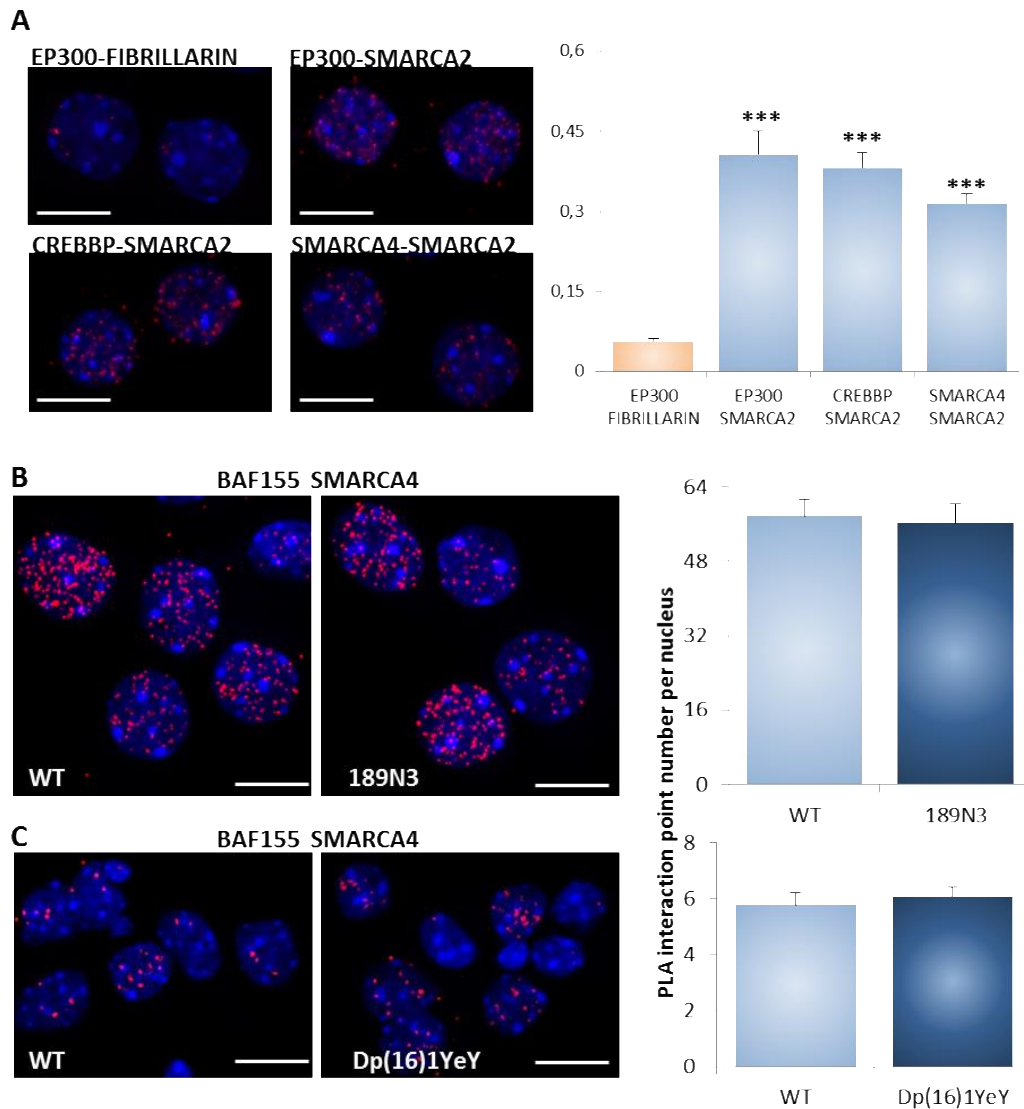
control. Nuclear bodies were labelled using Topro3 staining (blue fluorescence). Mean interaction point numbers per nuclear area were calculated in nuclear body of at least 25 transfected cortical neurons. *** $p < 0.0005$

D. Protein extracts of HEK293 cells were immunoprecipitated (IP) using anti-RNASEN antibody or anti-IgG antibody as a negative control. The input and precipitated fractions were then analyzed by Western blot using anti- RNASEN, anti-Dgcr8 and anti-Dyrk1a antibodies. Red arrows indicate protein bands at the expected size. Note that no cross-reaction was found with the IgGs.

E. *In situ* PLA on primary cortical neurons fixed at DIC7 (red fluorescence) using anti-Dyrk1a and anti-Fam53c antibodies, anti-Dyrk1a and anti-Tomm20 antibodies as a negative control. Dendritic network and dendritic spines were labelled using phalloidin staining (green fluorescence). Nuclear bodies were labelled using Topro3 staining (blue fluorescence). Mean interaction point numbers were calculated in nuclear body of at least 24 cortical neurons at DIC7.

F. Protein extracts of HEK293 cells were immunoprecipitated (IP) using anti-EP300 and anti-CREBBP antibodies or anti-IgG antibody as a negative control. The precipitated fractions were then analyzed by Western blot using anti-EP300, anti-Dyrk1a and anti-CREBBP antibodies (B2). Red arrows indicate protein bands at the expected size. Note that no cross-reaction was found with the IgGs.

Scale bars=10 μ m. *** $p < 0.0005$.

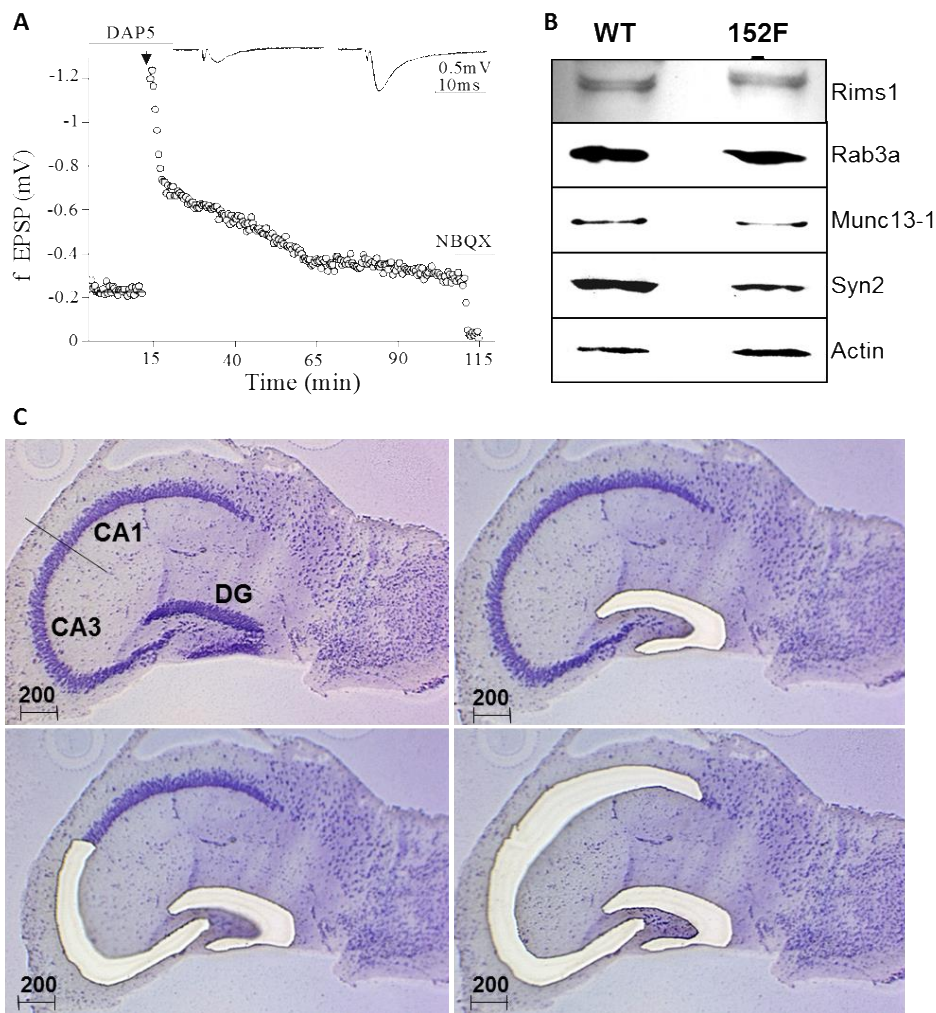


Supplementary Figure S3. Nuclear protein-protein interactions and mis-regulation of the interaction network in transgenic mouse DS models.

A. *In situ* proximity ligation assays (PLA) on primary cortical neurons fixed at DIC7 (red fluorescence) using anti-Ep300 and anti-Smarca2 antibodies, anti-Crebbp and anti-Smarca2 antibodies, anti-Smarca4 and anti-Smarca2 antibodies and anti-Ep300 and anti-Fibrillarin antibodies as a negative control. Nuclear bodies were labelled using Topro3 staining (blue fluorescence). Mean interaction point numbers were calculated in nuclear body of at least 48 cortical neurons at DIC7.

B. *In situ* PLA on transgenic 189N3 and WT primary cortical neurons fixed at DIC7 (red fluorescence) using anti-Baf155 and anti-Smarca4 antibodies. Nuclear bodies were labelled using Topro3 staining (blue fluorescence). Mean interaction point number calculated in nuclear body of at least 48 cortical neurons at DIC7.

C. *In situ* PLA on transgenic Dp(16)1YeY and WT primary cortical neurons fixed at DIC7 (red fluorescence) using anti-Baf155 and anti-Smarca4. Nuclear bodies were labelled using Topro3 staining (blue fluorescence). Mean interaction point numbers were calculated in nuclear body of 150 cortical neurons at DIC7. Scale bars=10µm. *** $p < 0.0005$

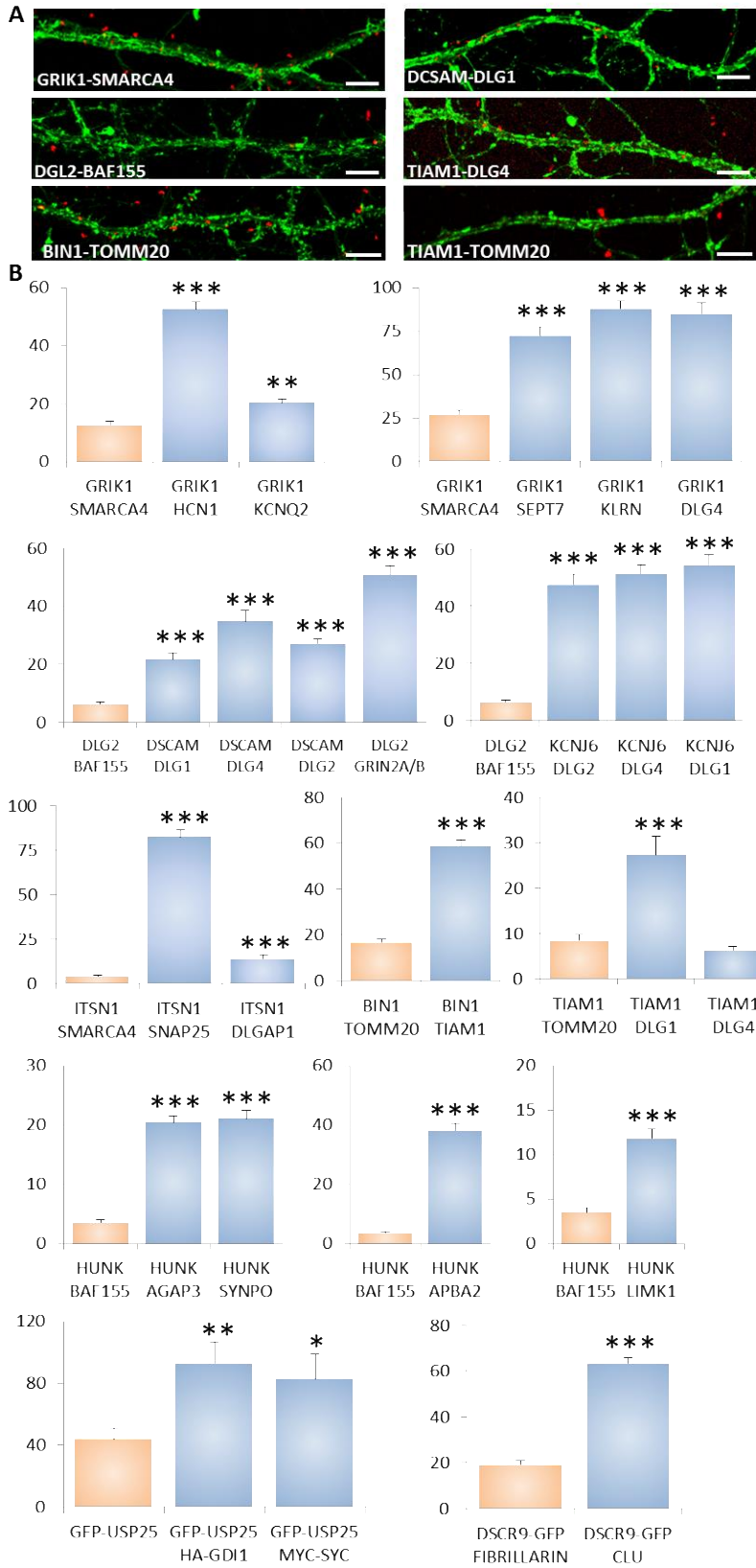


Supplementary Figure S4. Synaptic protein expression in the adult 152F7 mouse hippocampus as compared to control mice.

A. Time course of mossy fiber LTP in a wild-type mouse. Data are means \pm SEM and calculated from 4 different mice with 3 slices per mouse for each genotype. Mossy fiber LTP was induced by a single tetanus of 25 Hz (for 5 s, black arrow) in the presence of 50 μ M of DAP5. NBQX was applied to obtain information concerning the fiber volley.

B. Western blot of Rim1, Rab3a, Munc13-1 and Synapsin2A proteins from hippocampus extracts of wild-type and 152F7 transgenic mice. The amounts of protein were normalized to actin levels. Four to five hippocampi were pooled. There was a decrease in the amount of Synapsin2A in the 152F7 transgenic mice as compared to the wild-type (WT).

C. Laser-assisted microdissection of the three subregions of P21 mouse hippocampus stained with toluidine blue. Scale bar=200 μ m.

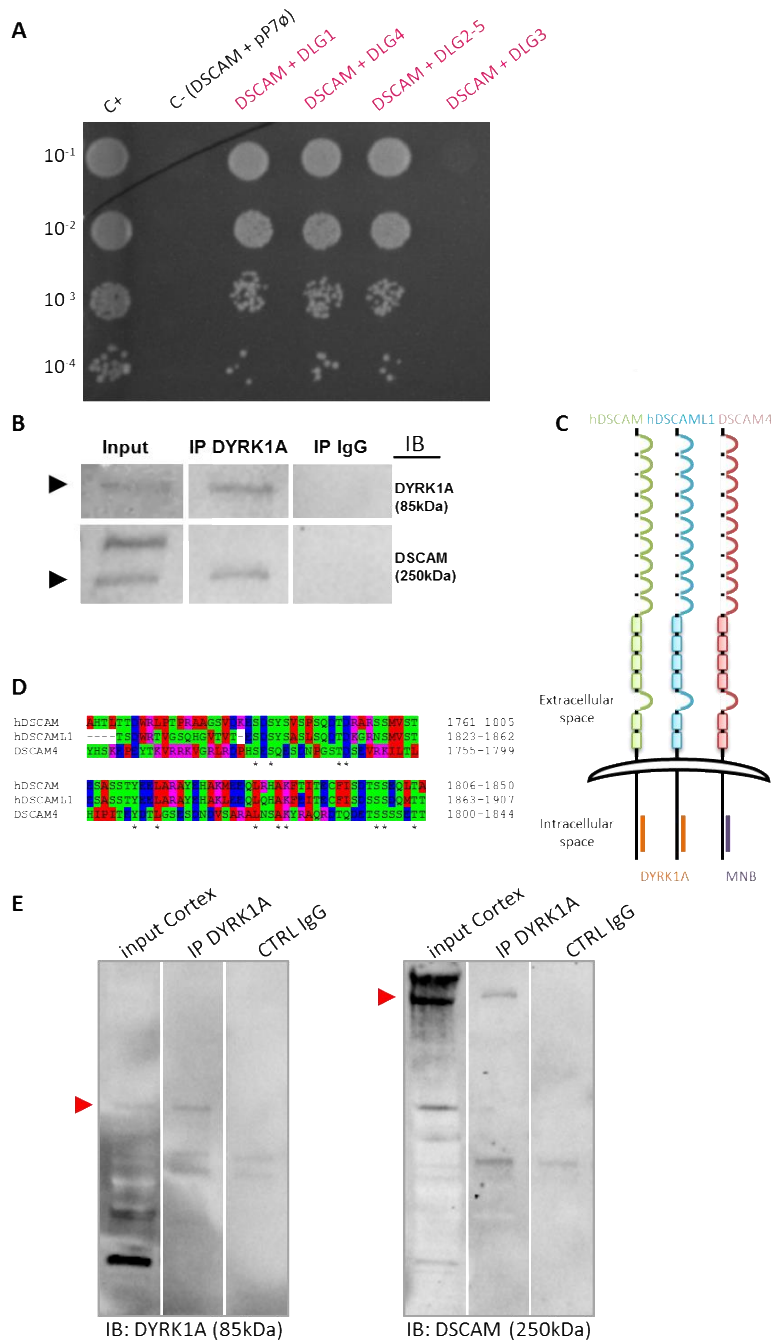


Supplementary Figure S5. Synaptic protein-protein interactions.

A. *In situ* proximity ligation assays (PLA) on primary cortical neurons fixed at DIC21 (red fluorescence) using anti-Grik1 and anti-Smarac4, anti-Dscam and anti-Dlg1, anti-Tiam1 and anti-Dlg4 antibodies. PLA using anti-Dlg2 and anti-Baf155, anti-Bin1 and anti-Tomm20 and anti-Tiam1 and anti-Tomm20 antibodies were performed as negative controls. Dendritic network and dendritic spines were labelled using phalloidin staining (green fluorescence).

B. Quantification of PLA interaction point numbers. Mean interaction point numbers were calculated in 150µm dendrites of at least 25 cortical neurons at DIC21, in GFP-USP25-expressed compartments of at least 17 transfected HEK293 cells and in DSCR9-GFP-expressed compartments of 30 transfected cortical neurons at DIC7.

Scale bars=10µm. *** $p < 0.0005$.



Supplementary Figure S6. DSCAM-DLG interactions

A. Yeast two-hybrid one-by-one assays revealed DSCAM as an interactor of DLG family.

C+: interaction positive control

C- (DSCAM + pP7 \emptyset): pB66-DSCAM + empty pP7 vector

DSCAM + DLG1: pB66-DSCAM + pP7-DLG1

DSCAM + DLG4: pB66-DSCAM + pP7-DLG4

DSCAM + DLG2-5: pB66-DSCAM + pP7-DLG2-5

DSCAM + DLG3: pB66-DSCAM + pP7-DLG3

B. Adult mouse cortical protein extracts were immunoprecipitated (IP) using anti-Dyrk1a antibody or anti-IgG antibody as a negative control. The input and precipitated fractions were then analyzed by Western blot using anti-Dyrk1a and anti-Dscam antibody. Note the band of 85 kDa expected for Dyrk1a and the 250 kDa band expected for Dscam. Note that no cross-reaction was found with the IgGs.

C. Schematic representation of DSCAM and DYRK1A protein family interaction. Human DSCAM (hDSCAM in green), human DSCAML1 (hDSCAML1 in blue) and its *Drosophila* ortholog (dDSCAM4 in red) share the same conserved domain interacting with human DYRK1A (hDYRK1A) or its *Drosophila* ortholog (MNB), respectively.

D. Amino acid alignment of the DYRK1A-interacting domain of the DSCAM protein family. This alignment was performed using the ClustalW 2.1 software.

E. Adult mouse cortical protein extracts were immunoprecipitated (IP) using anti-Dyrk1a antibody or anti-IgG antibody as a negative control. The input and precipitated fractions were then analyzed by Western blot using anti-Dyrk1a and anti-Dscam antibody. Red arrows indicate protein bands at the expected size. Note that no cross-reaction was found with the IgGs.

Article 4 : Fluorescent nanodiamond tracking reveals intraneuronal transport abnormalities induced by brain disease-related genetic risk factors

Dans le cadre de ma thèse, j'ai participé au projet de Simon Haziza sur l'utilisation des nanodiamants pour l'étude du transport intra-neuronal. J'y ai participé à la validation des lignées murines (expression protéique, Western Blot). Ce projet fait actuellement l'objet d'une soumission au journal Nature Nanotechnology.

Fluorescent nanodiamond tracking reveals intraneuronal transport abnormalities induced by brain disease-related genetic risk factors

Simon HAZIZA^{1,2,*}, Nitin MOHAN^{1,10}, Yann LOE-MIE², Aude-Marie LEPAGNOL-BESTEL², Sophie MASSOU^{1,11}, Marie-Pierre ADAM^{1,12}, Xuan Loc LE¹, Julia VIARD², Christine PLANCON³, Rachel DAUDIN², Pascale KOEBEL⁴, Feng-Jen HSIEH⁵, Chih-Che WU⁶, Brigitte POTIER², Yann HERAULT⁴, Carlo SALA⁷, Aiden CORVIN⁸, Huan-Cheng CHANG⁵, François TREUSSART^{1*} and Michel SIMONNEAU^{1,2,9,*}

¹ Laboratoire Aimé Cotton, CNRS, Univ. Paris-Sud, ENS Cachan, Université Paris-Saclay, 91405 Orsay, France

² Centre de Psychiatrie et Neurosciences, INSERM U894, Université Paris-Descartes, 75014 Paris, France

³ Centre National de Génotypage, 91057 Evry, France

⁴ Institut de génétique et de biologie moléculaire et cellulaire, CNRS UMR 7104, INSERM U 964, Université de Strasbourg, 67400 Illkirch-Graffenstaden, France

⁵ Institute of Atomic and Molecular Sciences, Academia Sinica, Taipei 106, Taiwan

⁶ Department of Applied Chemistry, National Chi Nan University, Puli, Nantou Hsien 545, Taiwan

⁷ Neuroscience Institute, CNR, 20129 Milano, Italy

⁸ Department of Psychiatry, Institute of Neuroscience, Trinity College Dublin, Dublin 2, Ireland

⁹ Department of Biology, ENS Cachan, Université Paris-Saclay, 94235 Cachan, France

¹⁰ Current address: Institut de Ciències Fotòniques (ICFO), 08860 Castelledefels, Spain

¹¹ Current address: Institut Interdisciplinaire de Neurosciences, CNRS, Université de Bordeaux, 33077 Bordeaux, France

¹² Current address: European Laboratory for Non-Linear Spectroscopy, University of Florence, 50019 Sesto Fiorentino, Italy

*emails: michel.simonneau@inserm.fr (M.S.), francois.treussart@ens-cachan.fr (F.T.) and simon.haziza@ens-cachan.fr (S.H.)

Common brain diseases, such as autism and Alzheimer's disease, each striking more than one percent of the world population, have a highly polygenic architecture displaying subtle changes in gene expression¹. Abnormalities of the intraneuronal transport have been linked to genetic risk factors found in patients^{2,3}, pointing out the relevance of monitoring this key biological process. However, current methods to measure the intraneuronal transport have limitations that prevent the detection of its slight modifications. Here, we report a sensitive approach based on tracking of fluorescent nanodiamonds (fNDs) inside branches of dissociated neurons. The high brightness, perfect photostability and absence of cytotoxicity⁴ make fND a probe of choice to perform high-throughput long-term tracking in living neurons with 12 nm spatial and 50 ms time resolutions. As a proof-of principle, we applied the fND-tracking assay on two transgenic mouse lines mimicking the slight protein concentration changes ($\approx 30\%$) found in brain of patients. In both cases, this nanoparticle-based methodology proves sufficiently sensitive to detect these subtle changes, paving the way for developments in translational nanomedicine.

A polygenic architecture of brain diseases as diverse as autism spectrum disorders, schizophrenia and late-onset Alzheimer's disease is emerging, with the discovery of interplay between hundreds of genetic variants and subtle changes in gene expression, later referred as genetic risk factors¹. The modeling of human brain diseases to understand the function of related genes usually relies on the establishment of transgenic mouse mimicking the effects of genetic changes⁵. As intraneuronal transport abnormalities have long been recognized to be linked to neuropsychiatric and neurodegenerative diseases^{2,3}, we decided to mimic *in vivo* the subtle changes induced by brain disease-related genetic variants and subsequently quantify their impact on the intraneuronal transport using primary cultures of mouse hippocampal neurons.

Previous attempts to quantify intraneuronal transport have been based on cargo labelling with genetic constructs of chimeric fluorescent proteins^{6,7}. Limitations of this strategy are low transfection yield, uncontrolled protein overproduction, photobleaching of the reporters, and substantial cytotoxicity. Fluorescent semiconductor nanocrystals (quantum dots, QDs) have been widely used to probe a variety of cellular events⁸, owing to their high photoluminescence yield and good photostability. However, attempts to use QDs to study intraneuronal transport have been limited to the specific model of long axons of dorsal root neurons cultured in microfluidic devices^{9,10}. Moreover, the toxicity of QDs constitutive elements potentially limits their use in long-lasting studies¹¹ and QDs blinking impedes high spatiotemporal resolution tracking. Considering these intrinsic limitations, there is a need for developing new generic approaches able to screen the functional impact of brain disease-related genetic modifications.

Here, we developed a novel quantitative assay based on tracking of fluorescent diamond nanocrystals (fluorescent NanoDiamond, fND) in mouse hippocampal neurons (Fig. 1, Supplementary Videos 1 and 2). We used 30 nm-sized fNDs (Supplementary methods and Fig. S1a), whose fluorescence stems from nitrogen-vacancy (NV) color centers created within the nanocrystals and acting as perfectly photostable and non-blinking emitters in the far-red spectral domain¹² (Supplementary Fig. 1b). Such remarkable properties have been already exploited in bio-applications requiring long-term tracking^{13,14}. Moreover, fNDs have been reported to show a notably low cellular toxicity in primary neurons¹⁵.

Fig. 1a shows the different steps of the fND-tracking assay, from neuron dissociation to video acquisition. To introduce fND into neurons, we used the endocytosis mechanism¹⁶. We subsequently tracked fND-containing endosomes by pseudo-Total Internal Reflection Fluorescence (pseudo-TIRF) video microscopy, with high-throughput (Fig. 1b) and 20 Hz frame rate, and then made a thorough quantitative analysis of their motion. Pseudo-TIRF microscopy excites only the region of interest, a few micrometers in depth above the culture glass substrate (Supplementary Fig. 1c), leading to a high signal-to-background ratio (SBR). We determined the localization precision of the setup for different SBR, using fNDs immobilized on a coverglass (see Methods), and achieved a localization precision smaller than 30 nm for SBR>3 (Fig. 1c). For the quantification of intraneuronal transport parameters, trajectories with more than 30% of constitutive points having a SBR<3 were excluded. Using such a filter, we obtained a mean localization precision of 12 nm over all trajectories (Inset of Fig. 1c).

Fig. 1d displays a white-light illumination image of a main neuronal branch and its smaller branches, merged with one frame of Supplementary Video 1 showing fNDs at different locations (red spots), two of which moving in the same branch (Fig.1e). Fig. 1f shows the kymograph of these two fNDs, highlighting the “stop-and-go” behavior characteristic of organelle transport in neurons¹⁷. For precise quantification of this motor-driven activity, we first extracted the fNDs trajectories from the videos and identified the “stop” and “go” phases (Supplementary Fig. 2, Fig. 1g) from which we inferred six intraneuronal transport readouts: velocity (in $\mu\text{m/s}$), run length (in μm), processivity (in seconds), pausing time (in seconds), pausing frequency (events per minute) and the diffusion coefficient (in $\mu\text{m}^2/\text{s}$).

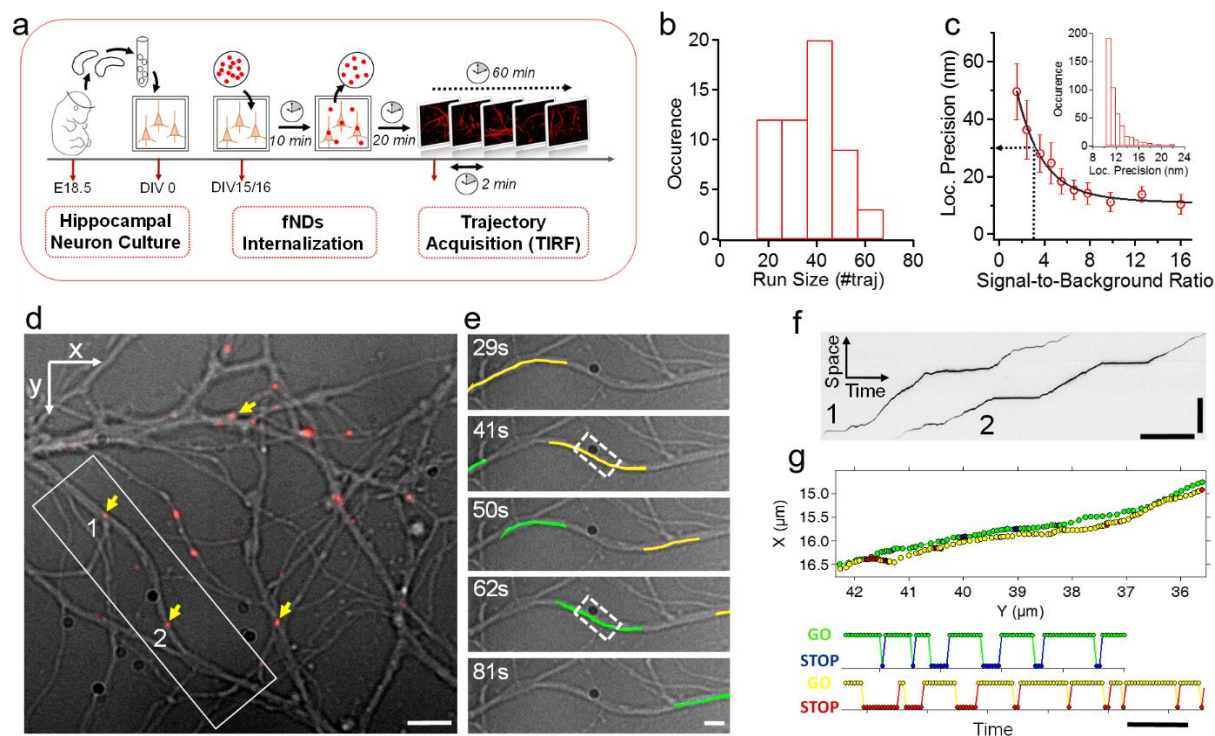


Figure 1 | Intra-neuronal transport monitoring by fluorescent nanodiamond tracking. **a**, Experimental pipeline from hippocampal neuron culture dissociated from E18.5 mouse embryo to endosome trajectory acquisition using pseudo-TIRF microscopy. DIV: day *in vitro*. **b**, Histogram of dataset sizes, i.e. number of trajectories exploited for readouts quantification. The mean value is 37 trajectories/run ($n=56$ runs). **c**, Localization precision versus signal-to-background ratio (SBR) of fNDs immobilized on a glass coverslip (from ~ 100 fNDs imaged over 200 frames; data plotted as mean \pm standard deviation). By applying a cut-off at SBR=3, we obtained a localization precision better than 30 nm. Inset: distribution of the mean localization precision for each fND-containing endosome trajectory ($n=460$ trajectories from 11 wild type experiments). **d**, Transmission white-light illumination image of the neuronal branches merged with the fluorescence channel (extracted from Supplementary Video 1) showing four fNDs moving within dendrites (yellow arrows). The cell soma associated with the main branch is on the left (not visible). During the two-minute movie, two fND-containing endosomes, labeled #1 and #2 (solid white line box) were observed moving towards the cell soma, in the same branch. **e**, Superimposition onto a white light image of the positions of these two fNDs (#1, in yellow; #2 in green), determined by particle tracking, with a persistence of 10 s, at different times. Scale bars: 5 μm in **(d)** and 1 μm in **(e)**. **f**, Kymograph of the motion of fNDs #1 and #2 shown in **(e)** (white box), illustrating their “stop-and-go” behavior. Scale bars: 15 μm (space) and 10 s (time). **g**, Top: trajectories of fND #1 and #2 extracted from the fluorescence video (dashed line rectangle in **(e)**). The two colors in each trajectory correspond to “go” phases (in green for fND #1 and yellow for fND #2) and “stop” phases (in blue for fND #1 and red for fND #2), as identified by our trajectory analysis algorithm (see Methods); bottom: two-state (“stop” and “go”) representation of the same trajectories over time: fND #1 moved faster than fND# 2 (scale bar: 1 s).

Velocity of fND-containing endosome was calculated as the length of the displacement vector over time from the first to the last point of a “go” phase, whereas the curvilinear distance and time separating these two points corresponded to run length and processivity, respectively. The diffusion coefficient D was calculated during the “go” phase, by fitting the mean-square displacement (MSD) to the quadratic equation $\text{MSD}(\Delta t) = v^2 \Delta t^2 + 4D \Delta t$, where v is the velocity.

According to the Stokes-Einstein law, D is inversely proportional to the intracellular viscosity. During a “stop” phase, the pausing time was defined as the duration from the first to the last point, the pausing frequency was the number of “stop” phases per minute.

We checked that these readouts remained constant during the 45-minute recordings for each culture well (Supplementary Fig. 3), and that there were no significant differences between the readout values for two independent experiments (Supplementary Fig. 4). Mean values and other statistical properties of these parameters are provided in Supplementary Table 1. Apart from these quantitative readouts, it is worth underlying that the fND-tracking assay can also provide a superresolution mapping of microtubule bundles in freely developing neuronal branches. For example, the two trajectories of Fig. 1g are separated by ≈ 100 nm, suggesting that the two fND-containing endosomes travel along two adjacent microtubules inside the same branch. Supplementary Fig. 5 and Supplementary Video 3 show another region in which four trajectories of endosomes can be seen in the same neuronal branch, no more than ≈ 400 nm apart. Moreover, adjacent trajectories are separated by a distance of about 40-160 nm, which is consistent with reported values^{9,18}.

We first tackle the sensitivity of the technic using a pharmacological drug impacting the microtubule-based intraneuronal transport, at nanomolar concentrations. This transport is dependent on the microtubule (MT) cytoskeleton integrity, and MT can be depolymerized by extracellular application of nocodazole. Here, we used 2 nM and 5 nM nocodazole concentration during the course of the 1 h-experiment, whereas this drug is standardly applied at micromolar concentrations for several hours^{19,20}. As shown in Fig. 2, we observed (i) a decrease in velocity ($p=3.8 \times 10^{-4}$ and $p=1.4 \times 10^{-7}$ for 2 nM and 5 nM respectively), in run length ($p=3.4 \times 10^{-4}$, $p=5.3 \times 10^{-6}$) and in processivity ($p=4.5 \times 10^{-3}$, $p=9.8 \times 10^{-5}$), and (ii) an increase in pausing time ($p=0.003$, $p=6.4 \times 10^{-5}$). Conversely, we observed a decrease in pausing frequency only for 5 nM ($p=0.016$) and the diffusion coefficient were not significantly affected (Supplementary Fig. 6). The increase in pausing time and decrease in run length and processivity are consistent with motors unable to overcome the microtubule interruption caused by depolymerization of the plus-end tips of microtubules. The constancy of the diffusion coefficient indicates that the viscosity is not affected inside neuronal branches. Altogether, intraneuronal transport parameters vary in a drug dosage-dependent manner and change as expected for MT depolymerization.

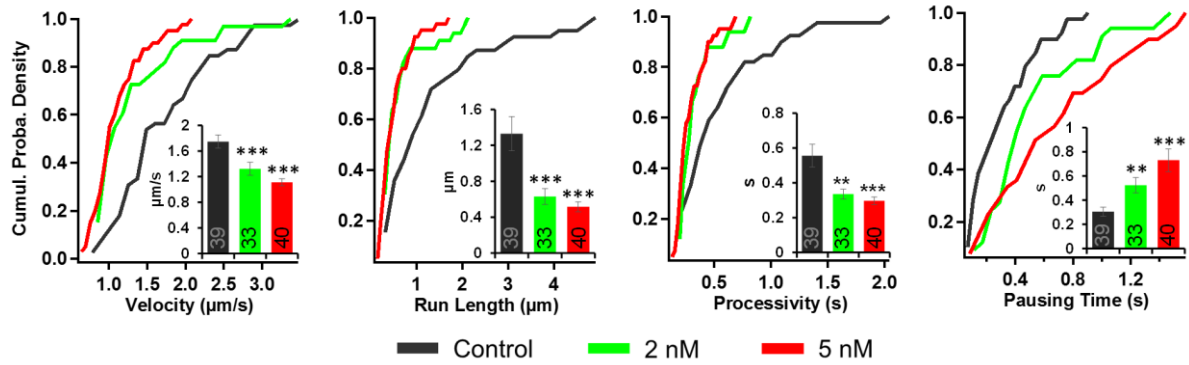


Figure 2 | Nanomolar sensitivity of the fND-tracking assay to nocodazole impairment of the microtubule cytoskeleton integrity. Cumulative probability densities of velocity, run length, processivity and pausing time, for control (black), concentrations of nocodazole of 2 nM (green) and 5 nM (red). Inset: bar plots presented as mean \pm s.e.m., which were calculated from the total number of trajectories. Figures written inside the bars represent the number of trajectories from $n=4$ embryos. Statistical significance: two stars (**) indicate a p value smaller than 0.01 and three stars (***) mean that $p < 0.001$.

Next we evaluated if the fND-tracking assay is sensitive enough to reveal the impact of slight protein concentration changes ($\approx 30\%$) found in brain of patients^{21,22} on the intraneuronal transport. We first assessed the sensitivity of the methodology to change in concentration of proteins directly bound to microtubule, such as TAU or MAP2. These molecules compete with molecular motors for MT binding sites, therefore acting as roadblocks²³. Genetic risk factors regulating the attachment/detachment of MAPs, such as the protein kinase coded by *MARK1* gene, have long been associated to Alzheimer's disease^{24,25} and Autism Spectrum Disorders (ASD)²¹. We generated two *Mark1* transgenic mouse lines (Fig. 3a) leading to three distinct *Mark1* overexpression levels, namely line 38 (L38^{het}, heterozygotes), line 8 (L8^{het}, heterozygotes) and line 8 (L8^{hom}, homozygotes). We first measured the protein levels of Mark1 in WT, L38^{het} and L8^{het} animals (Fig. 3b, Supplementary Fig. 7a). L38^{het} and WT were not statistically different ($8 \pm 4\%$, $p=0.85$), in contrast to L8^{het} ($32 \pm 6\%$, $p=0.011$). Therefore, we decided to test if this slight $\approx 30\%$ increase is sufficient to induce changes in intraneuronal transport parameters, taking advantage of four different genotypes: WT, L38^{het}, L8^{het} and L8^{hom} (Fig. 3c). The *Mark1* gene overexpression in L8^{hom} was measured by RT-QPCR to be twice that in L8^{het} ($42 \pm 5\%$ for L8^{het}, $p=0.0013$ and $87 \pm 15\%$ for L8^{hom}, $p=0.0010$). This measurement was done on the same primary cultures as the ones used for the fND-tracking assay, right after trajectories acquisitions.

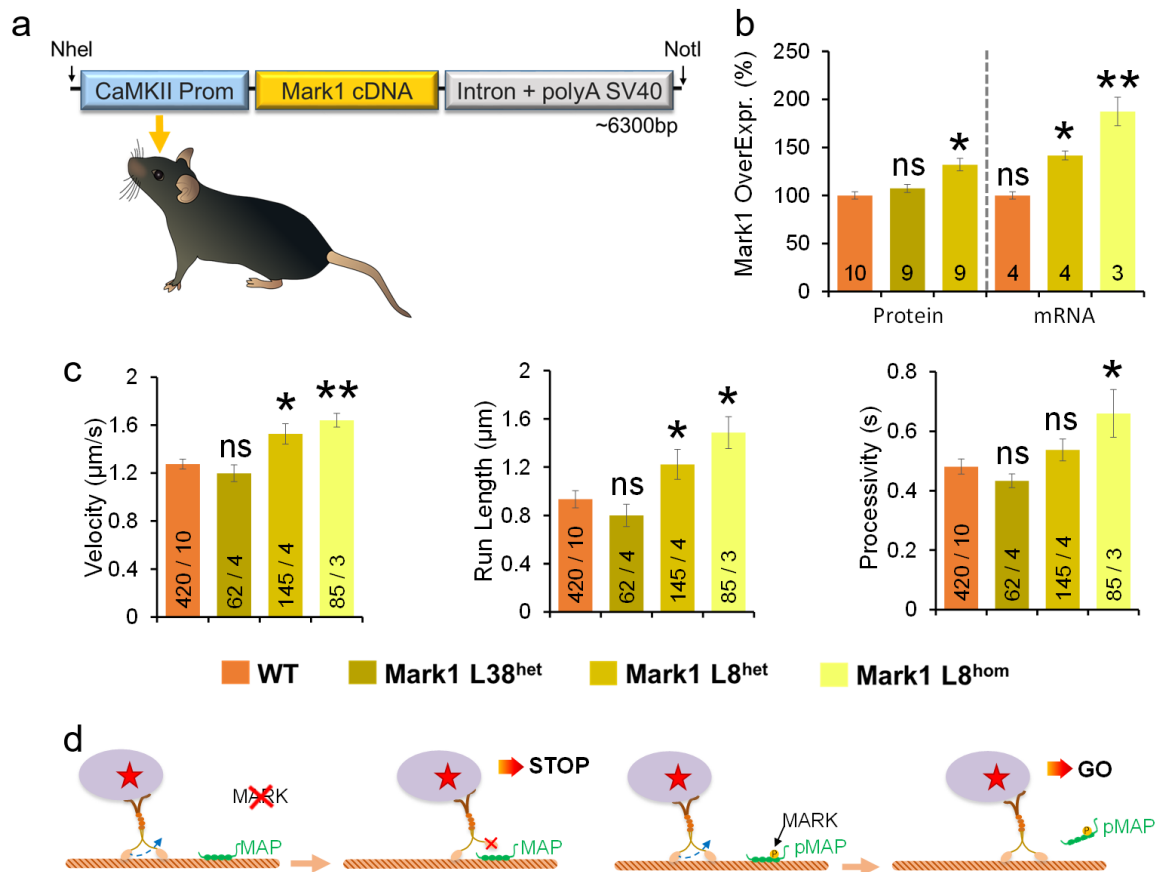


Figure 3 | Sensitivity of the fND-tracking assay to subtle concentration changes of autism-related Mark1 protein. **a**, Schematic representation of the *Mark1* transgene used to create transgenic mouse L38 and L8. **b**, Quantification of Mark1 gene overexpression levels. The protein levels of Mark1 in WT, L38^{het} and L8^{het} animals were measured by Western Blot. *Mark1* overexpression in WT, L8^{het} and L8^{hom} was evaluated by RT-QPCR (same neurons as the ones used in (c)). **c**, Effects of *Mark1* overexpression on velocity, run length and processivity intraneuronal transport parameters. **d**, Mechanistic model of the impact of Mark1 protein on intraneuronal transport, as described in Mandelkow *et al.*²⁴ and consistent with our data. All data are presented as mean \pm s.e.m. (calculated from the total number of samples in (b) or of independent cultures in (c)). Figures written inside the bars represent the number of samples in (b) or the number of trajectories/independent cultures in (c). Statistical significance: one star (*) indicates p value smaller than 0.05, two stars (**) are for $p < 0.01$.

Quantification of the intraneuronal transport dynamics revealed significant variations for L8^{het} and L8^{hom}, but not for L38^{het} in which no changes were observed in any of the readouts (Fig. 3c, Supplementary Fig. 7b). The latter is consistent with the absence of *Mark1* overexpression for this transgenic line, therefore acting as an internal control. In L8^{het} and L8^{hom}, the monotonous increase in *Mark1* gene overexpression levels was accompanied by a corresponding increase in velocity ($p = 0.03$, $p = 0.006$ for L8^{het}, L8^{hom} respectively), in run length ($p = 0.029$, $p = 0.022$ for L8^{het}, L8^{hom} respectively) and in processivity ($p=0.037$ for L8^{hom} respectively). We also obtained a decrease in pausing frequency for L8^{het} ($p=0.044$). Altogether, intraneuronal transport parameters vary in a gene dosage-dependent manner and they change as expected for Mark1-mediated regulation of

the microtubule track hindrance (Fig. 3d)²⁴. We therefore demonstrated the sensitivity of our assay to detect microtubule roadblock impairments linked to brain diseases, for protein concentration changes as small as $\approx 30\%$.

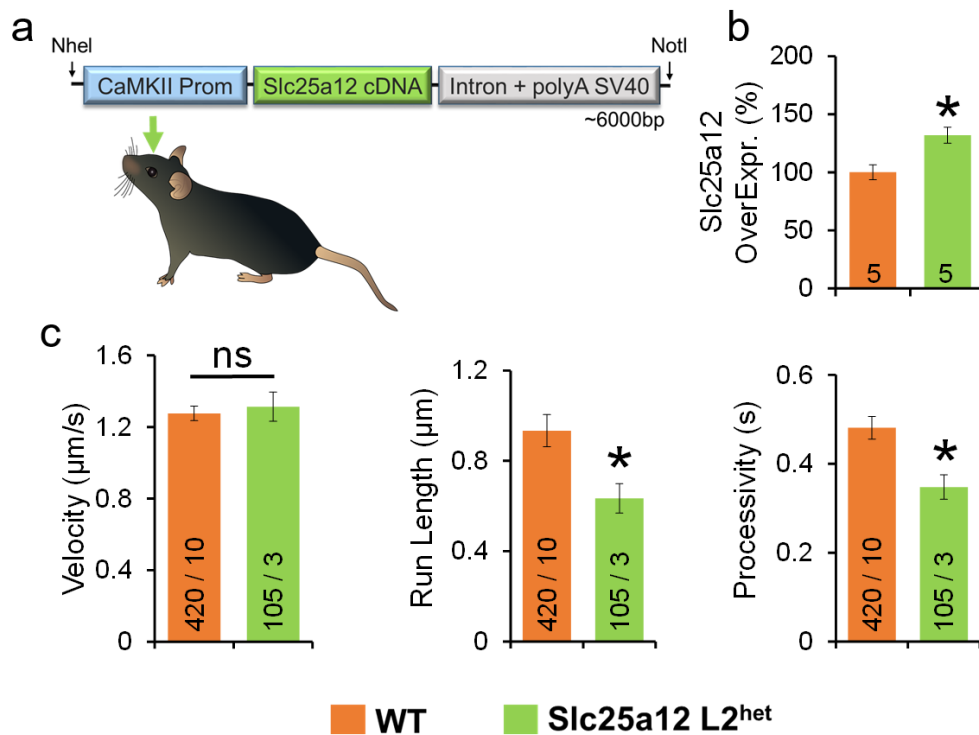


Figure 4 | Sensitivity of the fND-tracking assay to subtle overexpression of autism-related *Slc25a12*. **a**, Schematic representation of the *Slc25a12* transgene used to create transgenic mouse line *L2*. **b**, Quantification of *Slc25a12* overexpression in *L2^{het}* through its *Slc25a12* protein level (using Western Blot). **c**, Effects of *Slc25a12* overexpression on velocity, run length and processivity intraneuronal transport parameters. All data are presented as mean \pm s.e.m. (calculated from the total number of samples in (**b**) or of independent cultures in (**c**)). Figures written inside the bars represent the number of samples in (**b**) or the number of trajectories/independent cultures in (**c**). Statistical significance: one star (*) indicates p value smaller than 0.05.

Finally, we evaluated if the fND-tracking assay is sensitive enough to detect the effect of subtle concentration change of one protein that do not belong to microtubule complexes but is indirectly involved in the intraneuronal transport via energy supplies. We focused on the psychiatric risk factor *SLC25A12* that is required for the mitochondrial integrity and found associated with different types of ASD^{26,22} and with Schizophrenia²⁷. We generated one *Slc25a12* transgenic mouse line (*L2^{het}*) mimicking the slight overexpression of this gene as found in brain tissues of ASD patients^{22,28} (Fig. 4a). We measured *Slc25a12* protein levels in WT and *L2^{het}* and found a significant increase in *L2^{het}* ($32\pm 7\%$, $p=0.043$) (Fig. 4b, Supplementary Fig. 8). The quantification of the intraneuronal transport dynamic revealed significant variations with a decrease in run length ($p=0.022$) and processivity ($p=0.012$) (Fig. 4c). This result demonstrates the sensitivity of the

tracking assay to detect indirect intraneuronal transport perturbations, for protein concentration changes as small as $\approx 30\%$.

In this Letter, we have reported a hitherto unexplored approach to tackle the changes of intraneuronal transport parameters induced by brain disease-related genetic risk factors. Our methodology relies on fluorescent nanodiamond tracking inside freely developing branches of living neurons. The high brightness, perfect photostability and absence of cytotoxicity of fNDs make it possible to perform high throughput intracellular transport analysis. As a proof-of-principle, we established transgenic animals mimicking the subtle changes of protein concentrations ($\approx 30\%$) found in brain of patients. The fND-tracking assay was sensitive enough to detect modifications of the intraneuronal transport parameters in the transgenic neurons. To the best of our knowledge, this is the first direct measurement of the functional impact of brain disease-related genetic risk factors using a nanoparticle-based methodology.

In a near future, with the swift development of the CRISPR/Cas9 genome editing technology²⁹, it is possible to model multiple brain disease-related genetic risk factors in transgenic animals. Our fND tracking methodology is adapted to understand how these multiple genetic variants interact with each other to impair the intraneuronal transport. Furthermore, powerful methodologies to dissect the molecular basis of complex brain diseases are emerging such as 3D-human neuron cultures derived from induced pluripotent stem cells obtained from patients^{30,31}. Our fND-tracking assay can be instrumental to develop an unbiased diagnosis of neuropsychiatric and neurodegenerative diseases, opening the door to applications in translational nanomedicine.

Methods

Hippocampal neuron cultures and fNDs internalization. Hippocampi from E18.5 mouse embryos were isolated, chemically and mechanically dissociated, before being plated in LabTekII chamber (see Supplementary Methods). fNDs internalization was conducted at DIV15/16. The maintaining medium was set aside and replaced by 0.5 ml of Neurobasal phenol-free medium (Invitrogen) to which we added 5 μ l of \approx 30 nm-sized fND stock solution, reaching a final concentration of 5 μ g/ml. After 10 min incubation, the medium was replaced by the old maintaining medium and neurons were placed 20 min in the incubator before starting the video acquisition.

Video processing and trajectory analysis

We recorded videos of total duration of 120 s, at a time resolution of 50 ms/frame with Nikon NIS software in the proprietary ND2 format (Fig. 1a). A filtering pretreatment was done with Fiji software (version 1.46j; NIH, USA), which consists in subtracting to each frame the median intensity of the whole stack in order to remove static fluorescent spots. For each dynamic fND-containing endosome, we reconstructed the full trajectory using the Spot Tracker plugin of ICY software (GPLv3 open source) developed by the Quantitative Image Analysis team at Institut Pasteur (Paris, France)^{32,33}. Using the Track Manager plugin, we exported a text file containing the spot (X,Y) coordinates and the signal amplitude and background (based on a 2D-gaussian fitting of fluorescence spots), and we processed these data with a home-made program written for Igor Pro software (WaveMetrics Inc., USA). Detection of “stop” and “go” phases relies on two main steps, namely a coarse “stop” phase detection based on the confinement ratio function, and a refine “go” detection based on three different sequential filters as detailed in Supplementary Fig. 1 and S2. Transport readouts for each trajectory are then computed and the program finally makes a statistical report for the entire run set corresponding to one experiment, namely one LabTek well. The IgorPro program is available on request.

Localization precision

We calibrated the localization precision of our set-up by tracking the position of more than 100 fNDs immobilized on a glass coverslip and imaged over 100 frames. We then analyzed the video with the same tracking software parameters as for the intraneuronal trajectories. Movies were background-subtracted using Fiji plugin with a rolling ball of 20 pixels, in order to mimic the effect of a median subtraction. For each fND, the localization precision was measured as the standard deviation of the center positions of the fluorescent spot over time. We then plotted all localization precisions with respect to the signal-to-background ratio (SBR) associated to each fND (Fig. 1c). SBR was determined as the ratio of the maximum fluorescence intensity of the fND (amplitude minus residual background) over the residual background intensity. Therefore, trajectories containing more than 30% of points having a SBR smaller than 3 were not considered, so that according to the calibration, we achieved a localization precision better than 30 nm.

Transgenic mice constructs. We used a 3,200 bp mouse CamKII α and a regulatory sequence of 711 bp intron and polyA SV40 in a pGL3-basic vector. The pGL3-modified vector was realized in two steps: (i) the regulating sequence “intron+polyA SV40” (711 bp) was amplified by PCR from pCDNA1.1 vector with the following primers: forward 5'-TATATCTAGACCCGGGTGGACAAACTACCTACAGAG (XbaI site underlined) and reverse 5'-

TATAGGATCCGCGGCCGCAGAAATATGGCGTTGATACC (BamHI site underlined); (ii) the specific promoter “mouse minimal promoter CamKII α ” (3,200 bp) was amplified by PCR from mouse brain cDNA with the following primers: forward 5'-TATAGCTAGCGAGATTCTTCCAGCTAGTTC-3' (NheI site underlined) and reverse 5'-TATAAAGCTTCCGTGCTCCTGAGTGCAAAC-3' (HindIII site underlined). The XbaI/BamHI and then the NheI/HindIII digestion products of the amplicon were inserted into the two multiple cloning site of the pGL3 basic vector. *E. coli* DH5 α cells were co-transformed with these constructs. The coding regions of the mouse *Mark1* gene (2,386 bp) and mouse *Slc25a12* gene (2,034 bp) were amplified by PCR (sequences of primers and probes are available on request). The two HindIII/SmaI digestion products of the amplicons were inserted into the multiple cloning site of the pGL3 modified vector. *E. coli* DH5 α cells were co-transformed with this shuttle construct. Transgenes were injected in C57/Bl6 fertilized eggs for random integration into the mouse genome (CNRS SEAT/TAAM UPS 44, Villejuif, France). See Supplementary Methods for embryo genotyping, RT-QPCR and Western Blots.

References

1. McClellan, J. & King, M.-C. C. Genetic heterogeneity in human disease. *Cell* **141**, 210–7 (2010).
2. Hirokawa, N., Niwa, S. & Tanaka, Y. Molecular motors in neurons: transport mechanisms and roles in brain function, development, and disease. *Neuron* **68**, 610–38 (2010).
3. Millecamps, S. & Julien, J.-P. Axonal transport deficits and neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **14**, 161–76 (2013).
4. Schirhagl, R., Chang, K., Loretz, M. & Degen, C. L. Nitrogen-Vacancy Centers in Diamond: Nanoscale Sensors for Physics and Biology. *Annu. Rev. Phys. Chem.* **65**, 83–105 (2014).
5. de Angelis, M. H. *et al.* Analysis of mammalian gene function through broad-based phenotypic screens across a consortium of mouse clinics. *Nat. Genet.* **47**, 969–978 (2015).
6. Zala, D. *et al.* Vesicular glycolysis provides on-board energy for fast axonal transport. *Cell* **152**, 479–491 (2013).
7. Tang, Y. *et al.* Fast Vesicle Transport Is Required for the Slow Axonal Transport of Synapsin. *J. Neurosci.* **33**, 15362–15375 (2013).
8. Pinaud, F., Clarke, S., Sittner, A. & Dahan, M. Probing cellular events, one quantum dot at a time. *Nat. Methods* **7**, 275–285 (2010).
9. Mudrakola, H. V., Zhang, K. & Cui, B. Optically Resolving Individual Microtubules in Live Axons. *Structure* **17**, 1433–1441 (2009).
10. Chowdary, P. D., Che, D. L., Zhang, K. & Cui, B. Retrograde NGF Axonal Transport—Motor Coordination in the Unidirectional Motility Regime. *Biophys. J.* **108**, 2691–2703 (2015).
11. Tsoi, K. M., Dai, Q., Alman, B. A. & Chan, W. C. W. Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies. *Acc. Chem. Res.* **46**, 662–671 (2013).
12. Chang, Y.-R. *et al.* Mass production and dynamic imaging of fluorescent nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* **3**, 284–8 (2008).
13. Mohan, N., Chen, C.-S. S., Hsieh, H.-H. H., Wu, Y.-C. C. & Chang, H.-C. C. In Vivo Imaging and Toxicity Assessments of Fluorescent Nanodiamonds in *Caenorhabditis elegans*. *Nano Lett.* **10**, 3692–3699 (2010).
14. Wu, T. *et al.* Tracking the engraftment and regenerative capabilities of transplanted lung stem cells using fluorescent nanodiamonds. *Nat. Nanotechnol.* **8**, 682–689 (2013).
15. Huang, Y.-A. *et al.* The effect of fluorescent nanodiamonds on neuronal survival and morphogenesis. *Sci. Rep.* **4**, 6919 (2014).
16. Blanpied, T., Scott, D. & Ehlers, M. Dynamics and regulation of clathrin coats at specialized endocytic zones of dendrites and spines. *Neuron* **36**, 435–449 (2002).

17. Overly, C. C., Rieff, H. I. & Hollenbeck, P. J. Organelle motility and metabolism in axons vs dendrites of cultured hippocampal neurons. *J. Cell Sci.* **109**, 971–980 (1996).
18. Chen, J., KANAI, Y., Cowan, N. J. & HIROKAWA, N. Projection Domains of Map2 and Tau Determine Spacings Between Microtubules in Dendrites and Axons. *Nature* **360**, 674–676 (1992).
19. Jaworski, J. *et al.* Dynamic Microtubules Regulate Dendritic Spine Morphology and Synaptic Plasticity. *Neuron* **61**, 85–100 (2009).
20. Courty, S., Luccardini, C., Bellaiche, Y., Cappello, G. & Dahan, M. Tracking Individual Kinesin Motors in Living Cells Using Single Quantum-Dot Imaging. *Nano Lett.* **6**, 1491–1495 (2006).
21. Maussion, G. *et al.* Convergent evidence identifying MAP/microtubule affinity-regulating kinase 1 (MARK1) as a susceptibility gene for autism. *Hum. Mol. Genet.* **17**, 2541–51 (2008).
22. Lepagnol-Bestel, A. M. *et al.* SLC25A12 expression is associated with neurite outgrowth and is upregulated in the prefrontal cortex of autistic subjects. *Mol. Psychiatry* **13**, 385–97 (2008).
23. Lakadamyali, M. Navigating the cell: how motors overcome roadblocks and traffic jams to efficiently transport cargo. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 5907–16 (2014).
24. Mandelkow, E.-M. E., Thies, E., Trinczek, B. & Biernat, J. MARK/PAR1 kinase is a regulator of microtubule-dependent transport in axons. *J. Cell Biol.* **167**, 99–110 (2004).
25. Matarin, M. *et al.* Resource A Genome-wide Gene-Expression Analysis and Database in Transgenic Mice during Development of Amyloid or Tau Pathology Resource A Genome-wide Gene-Expression Analysis and Database in Transgenic Mice during Development of Amyloid or Tau Pathology. *Cell Rep.* **10**, 633–644 (2015).
26. Ramoz, N. *et al.* Linkage and association of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier SLC25A12 gene with autism. *Am. J. Psychiatry* **161**, 662–9 (2004).
27. Fromer, M. *et al.* De novo mutations in schizophrenia implicate synaptic networks. *Nature* **506**, 179–84 (2014).
28. Palmieri, L. *et al.* Altered calcium homeostasis in autism-spectrum disorders: evidence from biochemical and genetic studies of the mitochondrial aspartate/glutamate carrier AGC1. *Mol. Psychiatry* **15**, 38–52 (2010).
29. Doudna, J. A. & Charpentier, E. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science (80-.).* **346**, 1258096–1258096 (2014).
30. Choi, S. H. *et al.* A three-dimensional human neural cell culture model of Alzheimer's disease. *Nature* **515**, 274–278 (2014).
31. Paşca, A. M. *et al.* Functional cortical neurons and astrocytes from human pluripotent

- stem cells in 3D culture. *Nat. Methods* **12**, 671–678 (2015).
32. Chenouard, N. *et al.* Objective comparison of particle tracking methods. *Nat. Methods* **11**, 281–289 (2014).
 33. Chenouard, N., Bloch, I. & Olivo-Marin, J. C. Multiple hypothesis tracking for cluttered biological image sequences. *IEEE Trans. Pattern Anal. Mach. Intell.* **35**, 2736–2750 (2013).

Acknowledgments

We thank Paul Tchénio for his comments on the manuscript, Alain Lombard for his contribution to data processing, Joanna Lipecka for her help with western blotting. This work was supported by a public grant overseen by the French National research Agency (ANR) as part of the « Investissement d’Avenir » program IDEX Paris-Saclay ANR-11-IDEX- 0003-02 (S.H.); the ANR and the Ministry of Science and Technology (Taiwan) through grant ANR-2010-INTB-1002 (M.S., F.T., H.C.C., C.C.W.); the ANR through the Eranet Euronanomed project 2011-ERNA-006 (F.T., M.S., C.S., A.C.); the Fondation Jérôme Lejeune (M.S.), the European Union FP7-Health “AgedBrainSysBio” grant (M.S.); grant n°12018592 from Region Ile-de-France (F.T.); CNRS “Programme interdisciplinaire” (F.T., M.S.) and Triangle de la Physique contract no. 2012-038T (F.T., M.S.).

Authors contributions

SH, FT and MS conceived and designed the experiments; SH, NM, YLM, AMLB, MPA, SM, XLL, JV, CP and RD performed the experiments; SH, NM, SM, MPA and XLL analyzed the data; PK, FJH, CCW, BP, YH, CS, AC, and HCC contributed materials/analysis tools; SH, FT and MS wrote the paper.

Additional information

Supplementary information is available in the online version of the paper. Reprints and permissions information is available online at www.nature.com/reprints. Correspondence and requests for materials should be addressed to F.T. or M.S.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Supplementary Information

“Fluorescent nanodiamond tracking reveals intraneuronal transport abnormalities induced by brain disease-related genetic risk factors”

Simon HAZIZA *et al.*

Fluorescent nanodiamond production. The nanodiamonds were radiation-damaged with a high-energy (3 MeV) proton beam, as detailed in Su *et al.*²⁹ A thin diamond film (thickness < 50 μm) was prepared by depositing ≈5 mg of nanodiamond powder on a silicon wafer (1x1 cm² size) and subsequently subjected to the ion irradiation at a dose of ≈2x10¹⁶ H⁺.cm⁻². Afterwards, the radiation-damaged nanodiamonds were annealed at 800°C for 2 h to form fNDs. To remove graphitic carbon atoms on the surface, the freshly prepared fNDs were oxidized in air at 490°C for 2 h and microwave-cleaned in concentrated H₂SO₄–HNO₃ (3:1, v/v) at 100°C for 3 h. The average number of NV centers per fND is 15.

Pseudo-TIRF Microscopy setup, video acquisition and spatial resolution

TIRF illumination was implemented on a two-stages inverted microscope (Eclipse Ti-E, Nikon, Japan), equipped with 100x magnification and 1.49 numerical aperture immersion oil objective (CFI Apo TIRF 100X Oil, Nikon, Japan). The excitation beam from a continuous-wave diode-pumped solid-state laser emitting at the wavelength of 561 nm with a maximum power of 100 mW (SLIM-561-100, Oxixus S.A., France) was expanded 16x and then focused on the back focal plane of the microscope objective, off the propagation axis to ensure partial internal reflection at the culture dish glass - medium interface. This configuration results in wide-field illumination of a volume confined to ≈2 μm above this interface and to an in-plane disc of ≈40 μm diameter, ensuring a larger signal-to-background ratio than in epifluorescence configuration. The maximum laser intensity was 20 kW/cm² in the sample plane. We used filters adapted to the spectral characteristics of NV color centers in diamond: a dichroic beamsplitter with a steep edge at 561 nm and a 97% flat transmission above this wavelength (zt561rdc, Chroma Corp., USA) and a band-pass filter centered on 697 nm wavelength with a full-width at half maximum (FWHM) of 75 nm (HC 697/75, Semrock, USA), on the detection channel. White-light illumination observations were done with the differential interference contrast mode of the microscope without changing the microscope objective. The whole microscope was enclosed in a cage incubator (Okolab, Italy) allowing to maintain a temperature of 37°C, 5% partial CO₂ pressure and 100% hygrometry, necessary for live neuron imaging. Images and videos were recorded with a cooled electron multiplied CCD array detector (iXon-DU885, Andor Technology, Ireland), having a pixel size in the sample plane of 80 nm.

Primary hippocampal neuron cultures. For wild type neuron cultures, hippocampi from E18.5 OF1 mouse embryos were isolated in a dissecting medium (HBSS-Hepes) and hippocampus from at least four embryos were pooled together. Hippocampal neurons were then enzymatically dissociated (0.25% trypsin), mechanically triturated and plated on LabTek II (Nunc, USA) dishes (2x10⁵ cells per well) coated with poly-DL-ornithin (Sigma-Aldrich, USA), in DMEM (Invitrogen,

USA) supplemented with 10% foetal bovin serum (FBS), 0.1% GlutaMAX (Invitrogen) and 1% PenStrep (Invitrogen). Two hours after plating, DMEM was replaced by Neurobasal phenol-free medium (Invitrogen) supplemented with 0.1% GlutaMAX (Invitrogen), 2% B27 (Invitrogen) and 1% PenStrep (Invitrogen). Cultures from C57Bl6 transgenic mouse were conducted separately for each embryo and genotyping was performed elsewhere.

Microtubule destabilizing-drug experiment. Nocodazole powder were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and resuspended in dimethylsulfoxide (DMSO). Nocodazole was added to the cultures after fND protocol internalization and the DMSO volume added to each well was adjusted to be 0.5% of the total medium volume per well.

Mark1 and Slc25a12 DNA extraction and genotyping. Tissue from mouse hippocampus embryo was digested overnight at 55°C in the digesting buffer: Tris HCl pH=8 (50 mM), EDTA pH=8 (100 mM), NaCl (60 mM), SDS (1% w/v), complemented with 15 µl of proteinase K (Qiagen N.V., Netherlands). Inactivation was done at 99°C for 10 min and 3 µl of 1% (w/v) RNaseA (Thermo Fisher Scientific, USA) was added prior to incubation at 37°C for 90 min. DNA was then extracted in 300 µl of Phenol/Chloroform, and after 5 min centrifugation at 13200 rpm, aqueous phase was diluted elsewhere with 10% of sodium acetate (3 M concentration). Then, 800 µl of cold ethanol were added before freezing the solution at -80°C for 30 min, followed by 30 min of 13200 rpm centrifugation at 4°C. Supernatant was removed and the pellet was rinsed at least once with ethanol 70%. The pellet was finally dried at room temperature and resuspended in sterile water. PCR was then performed using primers for *Mark1* and *Slc25a12* as follow: UPCamKIIα GACTAAGTTGTCGCATCC; DW_Mark1: TGACGTAATGGAGTTTCTACAC; DW_Slc25a12: TTCAAATGTCACCTCTCCA. Each PCR amplification was prepared by mixing 0.5 U Hifi taq DNA polymerase (Life Technologies, USA) 1 µL of 10x Buffer, 2 mM MgSO₄, each deoxynucleoside triphosphate at a concentration of 0.2 mM, 1 µM of each of the corresponding primer, and 50 ng of genomic DNA A final volume of 10 µL was achieved using water. A negative control using all reagents except template DNA was also included. Reactions were carried out in a Mastercycler® pro S thermocycler (Eppendorf, Germany) using the following cycling conditions: 2 min at 95°C followed by 28 cycles of 95°C for 15 sec, 58°C (for *Mark1*) or 56°C (for *Slc25a12*) for 30 s, and 72°C for 30 s. A final extension step at 72°C for 7 min was performed after the cycles. After this step, samples were kept at 4°C until being electrophoresed in 1.5% agarose 1xTBE gels. For visualization of electrophoresed PCR products, gels were stained with 1xSYBR® Safe DNA Gel Stain (Life Technologies) and digital images were captured in a InGenius 3 (Syngene, UK).

Mark1 RNA extraction and RT-qPCR. Primary neuronal cells were collected in Trizol® (Life Technologies) for RNA extraction as described by the manufacturer. Reverse transcription (RT) was carried out at 50°C for 30 min in a 20 µl RT mixture containing 1 µg total RNA in Maxima First Strand Synthesis kit (Thermo Fisher Scientific) as described by the manufacturer. The cDNAs generated were amplified by real-time PCR, using probes (obtained from Merck Serono, Germany) labeled at their 5' ends with a fluorogenic reporter dye (FAM) and at their 3' ends with a quencher dye (TAMRA). Sequences of primers and probes are available on request. PCR assays had a final reaction volume of 20 µl, and contained 2 U of Taq polymerase (Applied Biosystems, USA), 10 µM primers and fluorogenic probe. PCR was carried out over 40 cycles of 95°C for 15 s, 60°C for 1 min and 50°C for 1 min. We used the DNA Engine Opticon 2 sequence detection system (Bio-rad, USA), with the Opticon Monitor software for data analysis. For each group, the cDNAs synthesized from total RNA were serially diluted

to cover the 0.19 ng to 50 ng range for specific mRNAs and 0.98 pg to 250 pg range for 18S rRNAs. These serial dilutions were used to construct standard curves for 18S and for each gene of interest and to calculate the amounts of RNA. Each qPCR signal was normalized with respect to 18S and expressed in arbitrary units.

Protein extraction and Western Blot. Hippocampus were dissected from P15 *Mark1* and *Slc25a12* transgenic mice and proteins were extracted in 100 μ l of lysis buffer: Tris HCl pH7.4 (20 mM), NaCl (100 mM), NP40 (1% v/v) and protease phosphatase inhibitor dose (Thermo Fisher Scientific). After milling and resting for 30 min on ice, centrifugation was performed at 13200 rpm at 4°C for 10 min. Supernatant was then removed and kept at -80°C until Western Blots were performed. Protein electrophoresis migration was performed in 4-20% Mini-PROTEAN Tetra TGX gels (Bio-Rad, USA) in a TGS buffer (Tris, 5 mM; Glycine, 192 mM; 0.1% SDS, pH 8.3) with 40 μ g of protein lysate after denaturation for 10 min at 95°C. Nitrocellulose membranes (Trans-Blot Turbo, Bio-Rad) were used for protein transfer. Membrane was then blocked in TBS 1X Tween 0.1%, 5% non-fat milk for 1 hour at RT under shaking. Primary antibody *Mark1* (ref. 3319S, Cell Signaling, USA) and *Slc25a12* (ref. ab107436, Abcam, UK) were incubated overnight at 4°C either in 5% BSA and in 5% milk respectively. Normalization was performed using Actin (ref A3854, Sigma Aldrich, USA) staining. Secondary HRP-conjugated antibodies were used in corresponding species and enzyme reaction was activated using Clarity Western ECL Substrate (GE Healthcare, USA), and imaged with ChemiDoc XRS (Bio-Rad). *Slc25a12* and *Mark1* quantification normalized to Actin were performed using images acquired at the best dynamic range (very few saturated pixels).

Statistical analysis. Comparison between two data sets was performed with the statistical analysis tools integrated in Igor Pro (WaveMetrics, USA). The pipeline analysis first applies a Kolmogorov-Smirnoff rank test of the null hypothesis “data follow a Gaussian (normal) distribution”. In most cases, normality hypothesis was rejected and thus a Mann-Whitney-Wilcoxon comparison two-tailed test was performed. When the normality hypothesis could not be rejected, two-samples two-tailed t-test was performed, after evaluating the null hypothesis of equal variance. Data collection for nocodazole and transgenic mouse experiments were performed blind to the conditions of the experiments. Stars are referred to the following significance level: * for $p < 0.05$; ** for $p < 0.01$; *** for $p < 0.001$.

Supplementary Video 1 | Fluorescent nanodiamonds moving inside neuronal branches corresponding to Fig. 1. Video from which Fig.1d-e snapshots were extracted (real speed of 20 frames/s). The white frame delimits the neuronal branch in which the endosomes containing fND #1 or fND #2 (same as in Fig. 1f kymographs) are moving. The fND locations are indicated during short periods of time by their number.

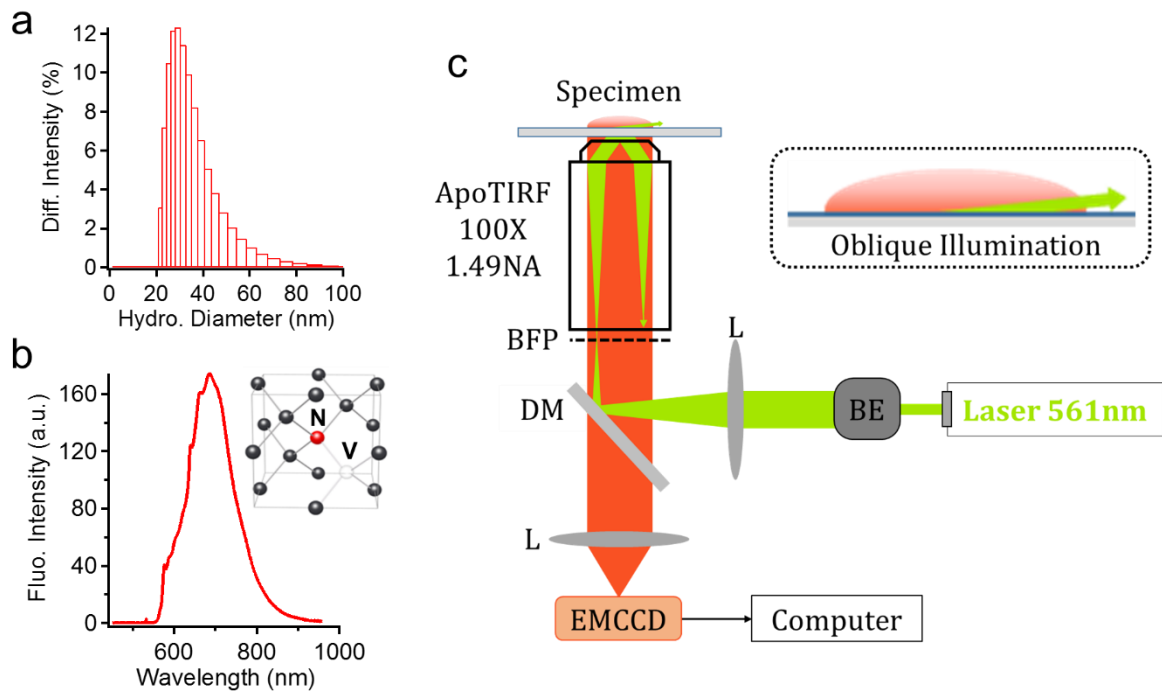
Supplementary Video 2 | Typical field of view showing several fluorescent nanodiamonds moving inside neuronal branches. Video of a typical field of view of primary neuron culture after fluorescent nanodiamonds internalization. (a) Video at real speed (20 frames/s) showing only the nanodiamonds motion (in red) with some persistence. (b) Merge of the video (without persistence) with the bright field DIC image of the same field of view, showing the neuronal branch in which the nanodiamonds move in a directed manner. The yellow star points a nanodiamond that has a fast erratic motion confined around a branch, and which may be bound to a membrane receptor moving back and forth along the branch.

Supplementary Video 3 | Superresolution mapping of a microtubule bundle by multiple fluorescent nanodiamonds tracking. Video of fND-containing endosomes having either retrograde (dynein driven) or anterograde (kinesin driven) motion. (a) Merged of DIC and TIRF (in red) images, the latter being formed from the accumulation of each TIRF video frame. Most fND traces are connected to a neuron soma located in the upper part of the field of view. (b) TIRF video showing four fND-containing endosomes having either a retrograde (fND going up) or anterograde (fND going down) motion in the neuronal branch located inside the white frame of a (real time of 20 frames/s). The yellow traces left correspond to the trajectories as inferred from our data processing.

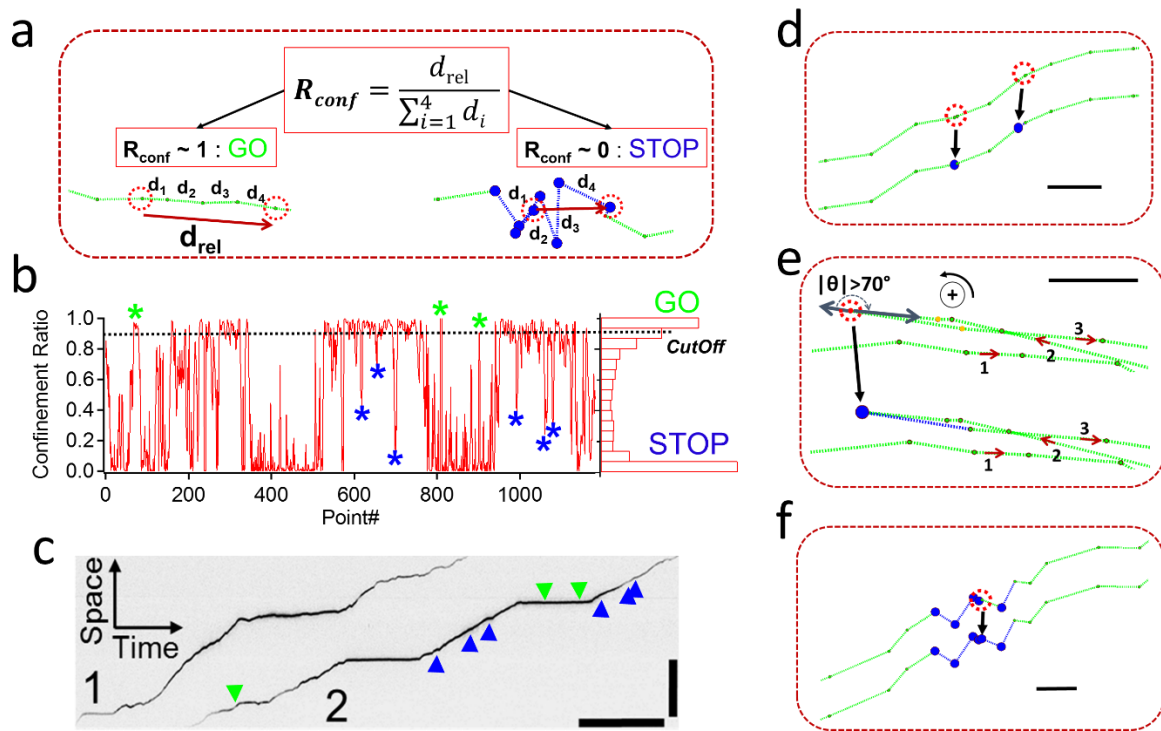
1. Supplementary Table

Readouts	Range	Median	Mean	Standard Deviation	Interquartile Range
Velocity ($\mu\text{m/s}$)	0.66 - 3.75	1.31	1.45	0.54	1.07 - 1.64
Processivity (s)	0.14 - 6.4	0.48	0.64	0.6	0.33 - 0.72
Run Length (μm)	0.19 – 15.54	0.93	1.5	1.98	0.56 - 1.63
Pausing Time (s)	0.05 – 9.78	0.32	0.48	1.04	0.18 - 0.53
Pausing Frequency (events/min)	5.2 – 129.3	64.1	64.5	24.6	48.1 - 78.5
Diffusion Coefficient ($\mu\text{m}^2/\text{s}$)	0.001 - 0.071	0.016	0.020	0.015	0.009 - 0.027
Signal-to-Noise Ratio	4.5 - 61.3	14.8	17.1	9.5	10.1 - 21.6

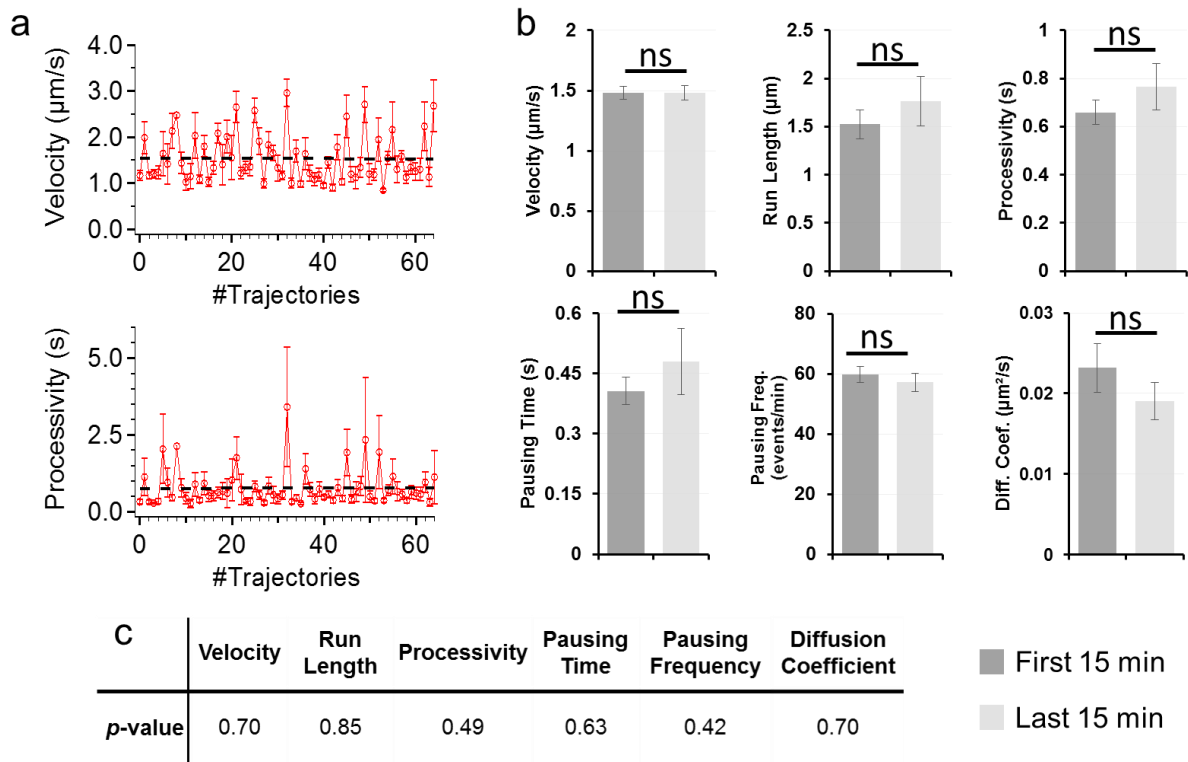
Supplementary Table 1 | Statistical analysis of intraneuronal transport parameters. All trafficking parameters were extracted from $n=460$ trajectories acquired from $n=11$ *C57Bl/6* mouse embryos. The range and interquartile range correspond to the 0-100% and 25-75% percentiles, respectively.



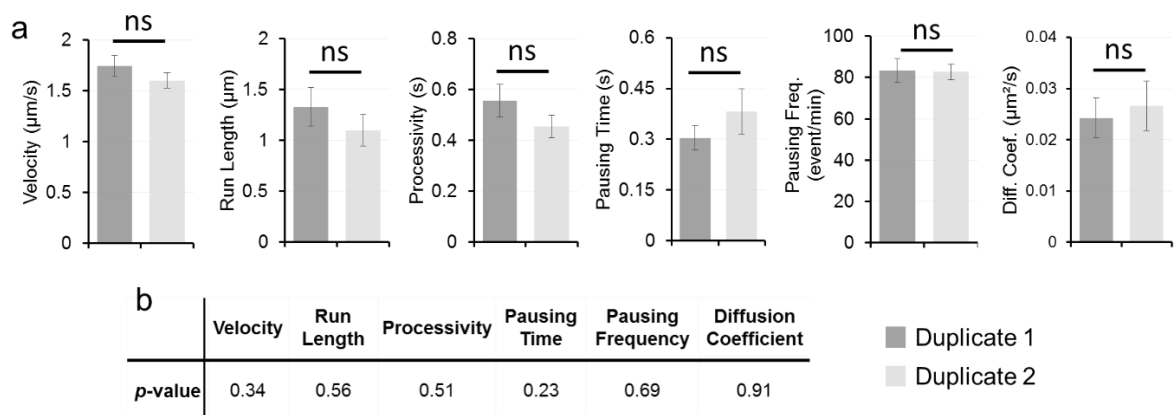
Supplementary Figure 1 | fNDs properties and video-microscopy set-up. **a**, Size distribution of the fND solution as measured by dynamic light scattering. fND mean size is 30 nm. **b**, Photoluminescence spectrum of a single fND, excited with a laser at 561 nm wavelength. Inset: NV point defect in the diamond crystallographic lattice. **c**, Home-made total internal reflection fluorescence video-microscope, providing oblique illumination. BE: beam expander, L: lenses, DM: dichroic beamsplitter, BFP: back focal plane, ApoTIRF: apochromatic oil immersion microscope objective of 100x magnification and 1.49 numerical aperture, EMCCD: electron-multiplying charged-couple device array detector.



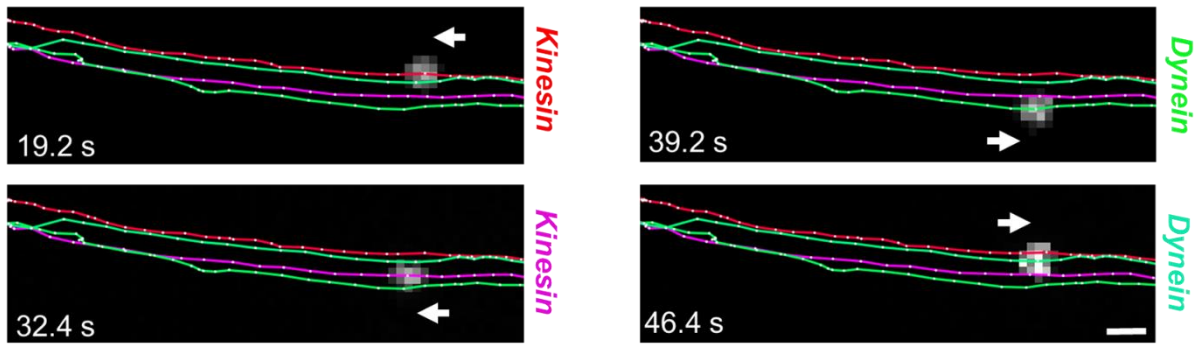
Supplementary Figure 2 | Detection of the “stop-and-go” motion phases. **a-b**, Coarse detection of “go” phases. **a**, The confinement ratio function R_{conf} is calculated for each trajectory point, using a forward sliding window of four consecutive points, as the relative distance d_{rel} between extreme positions $i=1$ and $i=4$ over the absolute distance $\sum_{i=1}^4 d_i$ ($i=1, \dots, 4$). R_{conf} is used to discriminate between static (“stop”) and directed (“go”) phases of motion, where $R_{conf} \approx 1$ corresponds to an endosome in a directed motion “go” state, and $R_{conf} \approx 0$ corresponds to the “stop” state. **b**, Graphical representation of R_{conf} function applied to trajectory #2 (Fig. 1), revealing the presence of these two phases, with a histogram for R_{conf} distribution on the right. In the trajectory analysis algorithm, a “go” or “stop” state is assigned to each trajectory point as a function of its R_{conf} value relative to a cutoff fixed at $R_{conf}^{cutoff}=0.9$ (horizontal dashed black line). Green and blue stars referred to short “go” and “stop” phase respectively. **c**, Kymograph of trajectory #1 and #2 showing green and blue arrow heads pointing out the same position as stars in (b). These events are usually missing when kymograph is used to infer velocity, run length and pausing time, leading to erroneous measurements. **(d-f)** Refined detection of “stop” phases. **d**, If two consecutive “go” state positions (depicted in green) are separated by a distance too small to be determined with precision (below the resolution of this method), the first is considered to be a “stop”. Scale bar: 100 nm. **e**, If the angle between two consecutive segments of motion is larger than 70 degrees, the point separating the two segments is considered to correspond to a “stop”. Scale bar: 50 nm. **f**, If a point within a “stop” region but is identified as a “go”, it is considered to be a positive false and is reassigned as a “stop”. Scale bar: 100 nm.



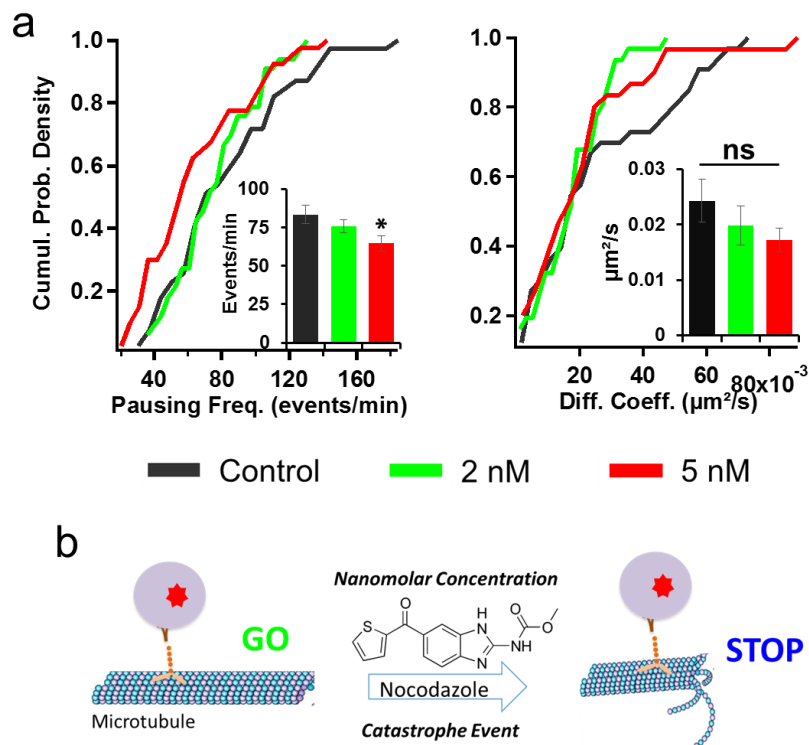
Supplementary Figure 3 | Intra-experiment stability of the method. **a**, Variation of two readouts (mean values of velocity and processivity) for 64 successive trajectories acquired from a single hippocampal neuron culture over a total duration of 45 minutes. The dashed black lines are linear fits to the data. Their slopes are -3.9×10^{-4} and 5.7×10^{-4} respectively, very close to 0, indicating no dependence of the experimental procedure on time. **b**, Comparison of the intraneuronal transport readouts between the first 15 minutes and the last 15 minutes of acquisition, for experiments carried out in triplicate. No statistically significant changes are observed. **c**, Corresponding Wilcoxon U-test *p*-values.



Supplementary Figure 4 | Inter-experiment stability of the method. **a**, Intraneuronal transport parameters for two different experiments: two cultures and two different pregnant females ($n > 30$ trajectories from $n = 4$ embryos each experiment). **b**, Corresponding Wilcoxon U-test *p*-values.

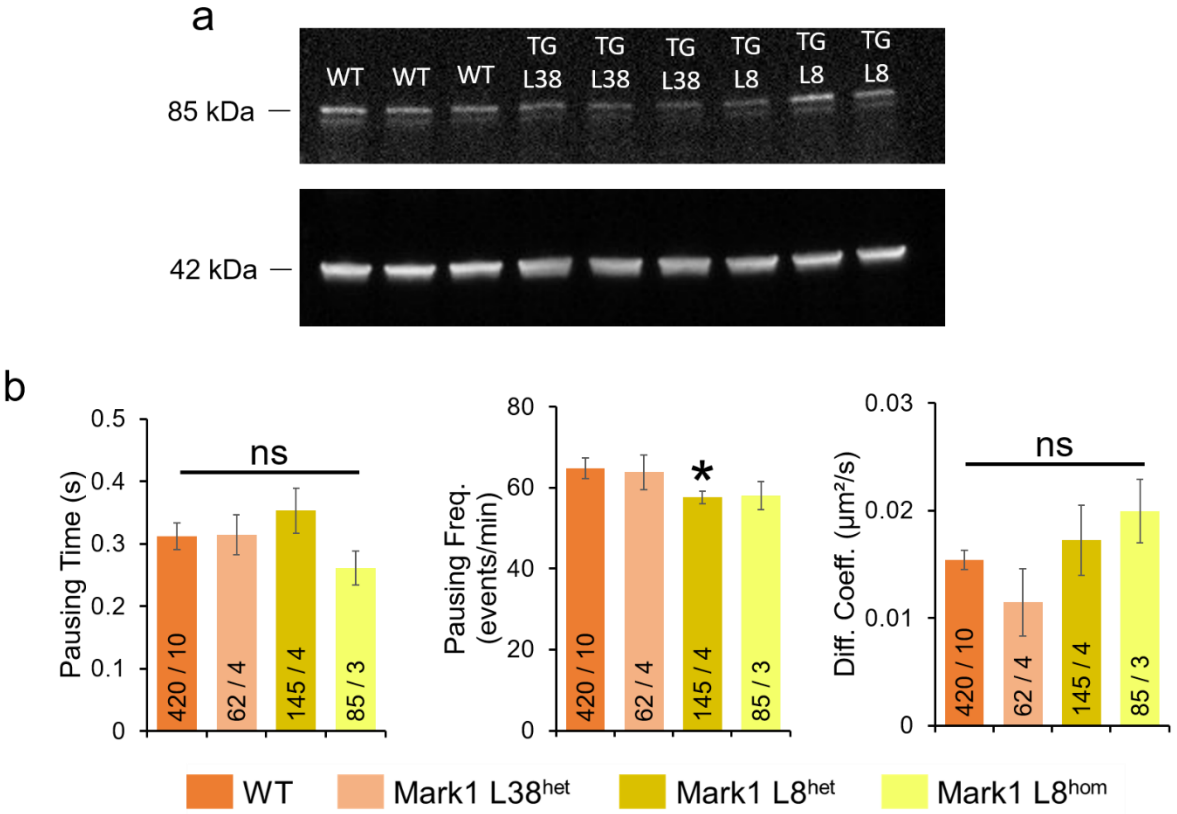


Supplementary Figure 5 | Superresolution mapping of a microtubule bundle by multiple fND tracking. Four trajectories of fND-containing endosomes, revealing underlying well separated microtubules within the same neuronal branch (see Supplementary Video 3). The endosomes are driven by kinesin (left, trajectories in red and purple colors) or dynein (right, trajectories in green and turquoise colors) motors. Scale bar: 400 nm.

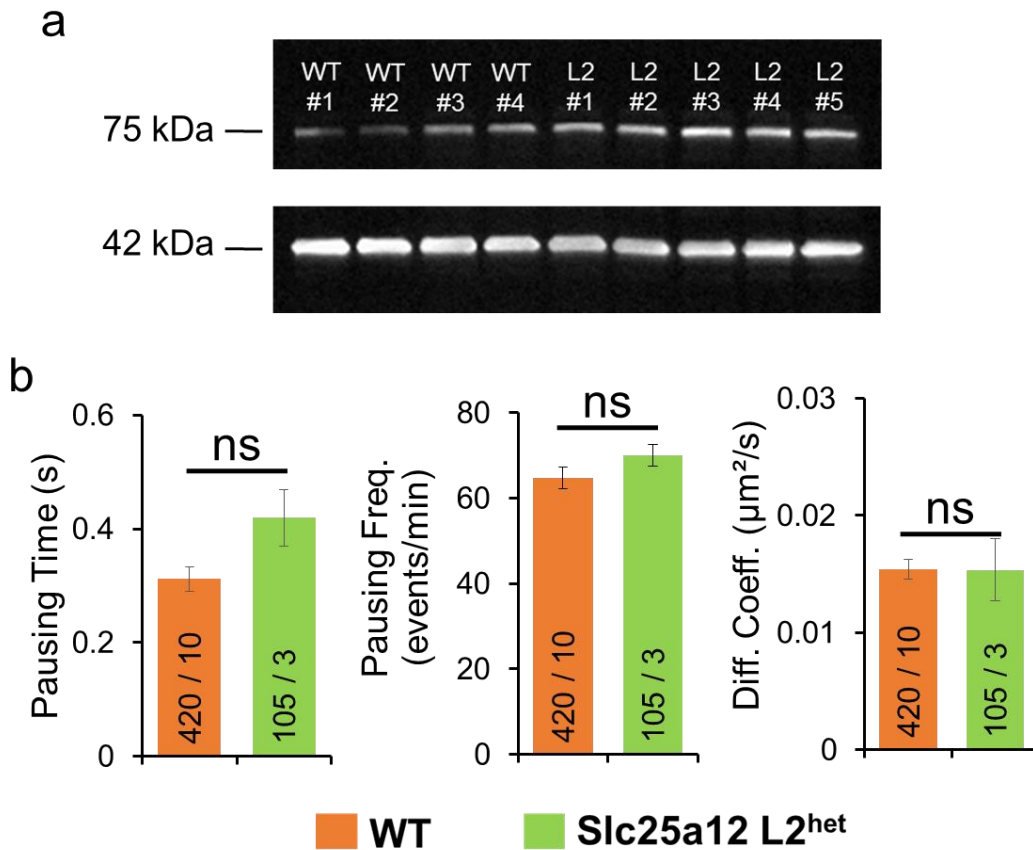


Supplementary Figure 6 | Additional intraneuronal transport parameters for nocodazole-mediated MT depolymerization. **a**, Cumulative probability densities with bar plots in the inset (mean \pm SEM) for two readouts for the control (black), 2 nM (green) and 5 nM (red) nocodazole ($n>35$ trajectories from $n=4$ embryos). Left: Pausing frequency decreases from 83.5 ± 5.8 events/min to 75.8 ± 4.4 events/s and 64.7 ± 5.0 events/min ($p=0.54$, $p=0.016$ respectively). Right: the diffusion coefficient was not significantly affected by the addition of nocodazole (p -values of $p=0.989$, $p=0.479$, $p=0.575$, respectively, for 2 nM nocodazole, and $p=0.379$, $p=0.18$, $p=0.544$, respectively, for 5 nM nocodazole).

b, Schematics of the depolymerization action of nocodazole at the +end microtubule tip, inducing a change of motion state of the fND-containing endosome from a “go” phase to a “stop” state.



Supplementary Figure 7 | Quantification of the overexpression of Mark1 in the hippocampus in transgenic lines and additional intraneuronal transport parameters. **a-b**, Western blotting (WB) was performed on hippocampal tissue dissected from P15 mice of the Mark1-transgenic lines L8^{het} and L38^{het}, with comparison to WT mice. WB was carried out with an antibody against Mark1 (**a**) and an antibody against actin (**b**) ($n=3$ P15 mice shown, $n=10$ performed). **b**, Pausing time, pausing frequency, and diffusion coefficient displayed no (or very little) significant differences for the Mark1-transgenic lines L38^{het}, L8^{het} and L8^{hom} ($p=0.684$, $p=0.787$, $p=0.164$, respectively, for L38^{het}; $p=0.413$, $p=0.044$, $p=0.337$, respectively, for L8^{het}; $p=0.252$, $p=0.252$, $p=0.187$, respectively, for L8^{hom}).



Supplementary Figure 8 | Quantification of the overexpression of Slc25a12 in the hippocampus of L2het transgenic mice; additional intraneuronal transport parameters.

a, Western blotting was performed on hippocampal tissue dissected from P15 mice from the Slc25a12-transgenic line L2^{het}, with comparison to WT mice. WB was carried out with an antibody against Slc25A12 (top) and an antibody against actin (bottom) ($n=5$ P15 mice both WT and TG). **b**, Pausing time, pausing frequency and diffusion coefficient displayed no significant differences for the Slc25a12-transgenic lines L2^{het} ($p=0.092$, $p=0.252$, $p=0.873$, respectively).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abreu-Villaça, Y., Filgueiras, C.C., and Manhães, A.C. (2011). Developmental aspects of the cholinergic system. *Behav. Brain Res.* *221*, 367–378.

Almeida, C.G., Takahashi, R.H., and Gouras, G.K. (2006). Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 4277–4288.

Alves da Costa, C., Paitel, E., Mattson, M.P., Amson, R., Telerman, A., Ancolio, K., Checler, F., and Mattson, M.P. (2002). Wild-type and mutated presenilins 2 trigger p53-dependent apoptosis and down-regulate presenilin 1 expression in HEK293 human cells and in murine neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 4043–4048.

Alzheimer, A. (1907). Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde. *Allgem Z Psychiatr.*

Alzheimer, A. (1911). Über eigenartige Krankheitsfälle des späteren Alters. *Z Gesam Neurol Psychiatr Bucur.*

Andersen, O.M., Reiche, J., Schmidt, V., Gotthardt, M., Spoelgen, R., Behlke, J., von Arnim, C.A.F., Breiderhoff, T., Jansen, P., Wu, X., et al. (2005). Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 13461–13466.

Andersen, P., Bliss, T.V., Lomo, T., Olsen, L.I., and Skrede, K.K. (1969). Lamellar organization of hippocampal excitatory pathways. *Acta Physiol. Scand.* *76*, 4A–5A.

Andorfer, C., Acker, C.M., Kress, Y., Hof, P.R., Duff, K., and Davies, P. (2005). Cell-cycle reentry and cell death in transgenic mice expressing nonmutant human tau isoforms. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *25*, 5446–5454.

Andrews-Zwilling, Y., Bien-Ly, N., Xu, Q., Li, G., Bernardo, A., Yoon, S.Y., Zwilling, D., Yan, T.X., Chen, L., and Huang, Y. (2010). Apolipoprotein E4 causes age- and Tau-dependent impairment of GABAergic interneurons, leading to learning and memory deficits in mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *30*, 13707–13717.

Bading, H., and Greenberg, M.E. (1991). Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by NMDA receptor activation. *Science* *253*, 912–914.

Barclay, J.W., Craig, T.J., Fisher, R.J., Ciuffo, L.F., Evans, G.J.O., Morgan, A., and Burgoyne, R.D. (2003). Phosphorylation of Munc18 by protein kinase C regulates the kinetics of exocytosis. *J. Biol. Chem.* *278*, 10538–10545.

Barger, S.W., and Harmon, A.D. (1997). Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature* *388*, 878–881.

Baron, J.C., Chételat, G., Desgranges, B., Percey, G., Landeau, B., de la Sayette, V., and Eustache, F. (2001). In vivo mapping of gray matter loss with voxel-based morphometry in mild Alzheimer's disease. *NeuroImage* *14*, 298–309.

- Bateman, R.J., Xiong, C., Benzinger, T.L.S., Fagan, A.M., Goate, A., Fox, N.C., Marcus, D.S., Cairns, N.J., Xie, X., Blazey, T.M., et al. (2012). Clinical and biomarker changes in dominantly inherited Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* *367*, 795–804.
- Beffert, U., Aumont, N., Dea, D., Lussier-Cacan, S., Davignon, J., and Poirier, J. (1998). Beta-amyloid peptides increase the binding and internalization of apolipoprotein E to hippocampal neurons. *J. Neurochem.* *70*, 1458–1466.
- Bertram, L., and Tanzi, R.E. (2009). Genome-wide association studies in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* *18*, R137-145.
- Bertram, L., McQueen, M.B., Mullin, K., Blacker, D., and Tanzi, R.E. (2007). Systematic meta-analyses of Alzheimer disease genetic association studies: the AlzGene database. *Nat. Genet.* *39*, 17–23.
- Bertram, L., Lange, C., Mullin, K., Parkinson, M., Hsiao, M., Hogan, M.F., Schjeide, B.M.M., Hooli, B., Divito, J., Ionita, I., et al. (2008). Genome-wide association analysis reveals putative Alzheimer's disease susceptibility loci in addition to APOE. *Am. J. Hum. Genet.* *83*, 623–632.
- Bertram, L., Lill, C.M., and Tanzi, R.E. (2010). The genetics of Alzheimer disease: back to the future. *Neuron* *68*, 270–281.
- Bhalla, A., Vetanovetz, C.P., Morel, E., Chamoun, Z., Di Paolo, G., and Small, S.A. (2012). The location and trafficking routes of the neuronal retromer and its role in amyloid precursor protein transport. *Neurobiol. Dis.* *47*, 126–134.
- Biederer, T., and Südhof, T.C. (2000). Mints as adaptors. Direct binding to neurexins and recruitment of munc18. *J. Biol. Chem.* *275*, 39803–39806.
- Biffi, A., Anderson, C.D., Desikan, R.S., Sabuncu, M., Cortellini, L., Schmansky, N., Salat, D., Rosand, J., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (ADNI) (2010). Genetic variation and neuroimaging measures in Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *67*, 677–685.
- Bliss, T.V., and Lomo, T. (1973). Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J. Physiol.* *232*, 331–356.
- Boekhoorn, K., Joels, M., and Lucassen, P.J. (2006). Increased proliferation reflects glial and vascular-associated changes, but not neurogenesis in the presenile Alzheimer hippocampus. *Neurobiol. Dis.* *24*, 1–14.
- Bongmba, O.Y.N., Martinez, L.A., Elhardt, M.E., Butler, K., and Tejada-Simon, M.V. (2011). Modulation of dendritic spines and synaptic function by Rac1: a possible link to Fragile X syndrome pathology. *Brain Res.* *1399*, 79–95.
- Borgdorff, A.J., and Choquet, D. (2002). Regulation of AMPA receptor lateral movements. *Nature* *417*, 649–653.
- Braak, H., and Braak, E. (1991). Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *82*, 239–259.
- Bramham, C.R. (2008). Local protein synthesis, actin dynamics, and LTP consolidation. *Curr. Opin. Neurobiol.* *18*, 524–531.

Brecht, W.J., Harris, F.M., Chang, S., Tesseur, I., Yu, G.-Q., Xu, Q., Dee Fish, J., Wyss-Coray, T., Buttini, M., Mucke, L., et al. (2004). Neuron-specific apolipoprotein e4 proteolysis is associated with increased tau phosphorylation in brains of transgenic mice. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *24*, 2527–2534.

Brier, M.R., Thomas, J.B., Snyder, A.Z., Benzinger, T.L., Zhang, D., Raichle, M.E., Holtzman, D.M., Morris, J.C., and Ances, B.M. (2012). Loss of intranetwork and internetwork resting state functional connections with Alzheimer's disease progression. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 8890–8899.

Bröer, S., and Brookes, N. (2001). Transfer of glutamine between astrocytes and neurons. *J. Neurochem.* *77*, 705–719.

Brown, M.W., and Aggleton, J.P. (2001). Recognition memory: what are the roles of the perirhinal cortex and hippocampus? *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 51–61.

Brundin, P., Melki, R., and Kopito, R. (2010). Prion-like transmission of protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 301–307.

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

Buée, L., Bussièrre, T., Buée-Scherrer, V., Delacourte, A., and Hof, P.R. (2000). Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *33*, 95–130.

Butler, M.H., David, C., Ochoa, G.C., Freyberg, Z., Daniell, L., Grabs, D., Cremona, O., and De Camilli, P. (1997). Amphiphysin II (SH3P9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *J. Cell Biol.* *137*, 1355–1367.

Cao, D., Lu, H., Lewis, T.L., and Li, L. (2007). Intake of sucrose-sweetened water induces insulin resistance and exacerbates memory deficits and amyloidosis in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* *282*, 36275–36282.

Caspersen, C., Wang, N., Yao, J., Sosunov, A., Chen, X., Lustbader, J.W., Xu, H.W., Stern, D., McKhann, G., and Yan, S.D. (2005). Mitochondrial Abeta: a potential focal point for neuronal metabolic dysfunction in Alzheimer's disease. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* *19*, 2040–2041.

Cataldo, A.M., Barnett, J.L., Pieroni, C., and Nixon, R.A. (1997). Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *17*, 6142–6151.

Cataldo, A.M., Peterhoff, C.M., Troncoso, J.C., Gomez-Isla, T., Hyman, B.T., and Nixon, R.A. (2000). Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am. J. Pathol.* *157*, 277–286.

Cestra, G., Castagnoli, L., Dente, L., Minenkova, O., Petrelli, A., Migone, N., Hoffmüller, U., Schneider-Mergener, J., and Cesareni, G. (1999). The SH3 domains of endophilin and amphiphysin bind to the proline-rich region of synaptotagmin 1 at distinct sites that display an unconventional binding specificity. *J. Biol. Chem.* *274*, 32001–32007.

- Chapuis, J., Hansmannel, F., Gistelinck, M., Mounier, A., Van Cauwenberghe, C., Kolen, K.V., Geller, F., Sottejeau, Y., Harold, D., Dourlen, P., et al. (2013). Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol. Psychiatry* 18, 1225–1234.
- Chater, T.E., and Goda, Y. (2014). The role of AMPA receptors in postsynaptic mechanisms of synaptic plasticity. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 401.
- Chauhan, G., Adams, H.H.H., Bis, J.C., Weinstein, G., Yu, L., Töglhofer, A.M., Smith, A.V., J van der Lee, S., Gottesman, R.F., Thomson, R., et al. (2015). Association of Alzheimer's disease GWAS loci with MRI markers of brain aging. *Neurobiol. Aging.*
- Chételat, G. aël, and Baron, J.-C. (2003). Early diagnosis of alzheimer's disease: contribution of structural neuroimaging. *NeuroImage* 18, 525–541.
- Chételat, G., Desgranges, B., and Eustache, F. (2006). [Brain profile of hypometabolism in early Alzheimer's disease: relationships with cognitive deficits and atrophy]. *Rev. Neurol. (Paris)* 162, 945–951.
- Chishti, M.A., Yang, D.S., Janus, C., Phinney, A.L., Horne, P., Pearson, J., Strome, R., Zuker, N., Loukides, J., French, J., et al. (2001). Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695. *J. Biol. Chem.* 276, 21562–21570.
- Cingolani, L.A., and Goda, Y. (2008). Actin in action: the interplay between the actin cytoskeleton and synaptic efficacy. *Nat. Rev. Neurosci.* 9, 344–356.
- Citron, M., Westaway, D., Xia, W., Carlson, G., Diehl, T., Levesque, G., Johnson-Wood, K., Lee, M., Seubert, P., Davis, A., 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.
- Cleary, J.P., Walsh, D.M., Hofmeister, J.J., Shankar, G.M., Kuskowski, M.A., Selkoe, D.J., and Ashe, K.H. (2005). Natural oligomers of the amyloid-beta protein specifically disrupt cognitive function. *Nat. Neurosci.* 8, 79–84.
- Cole, G.M., and Ard, M.D. (2000). Influence of lipoproteins on microglial degradation of Alzheimer's amyloid beta-protein. *Microsc. Res. Tech.* 50, 316–324.
- Collingridge, G.L., Kehl, S.J., and McLennan, H. (1983). Excitatory amino acids in synaptic transmission in the Schaffer collateral-commissural pathway of the rat hippocampus. *J. Physiol.* 334, 33–46.
- Collingridge, G.L., Peineau, S., Howland, J.G., and Wang, Y.T. (2010). Long-term depression in the CNS. *Nat. Rev. Neurosci.* 11, 459–473.
- Collingwood, J.F., Chong, R.K.K., Kasama, T., Cervera-Gontard, L., Dunin-Borkowski, R.E., Perry, G., Pósfai, M., Siedlak, S.L., Simpson, E.T., Smith, M.A., et al. (2008). Three-dimensional tomographic imaging and characterization of iron compounds within Alzheimer's plaque core material. *J. Alzheimers Dis. JAD* 14, 235–245.
- Colton, C.A., Needham, L.K., Brown, C., Cook, D., Rasheed, K., Burke, J.R., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., and Vitek, M.P. (2004). APOE genotype-specific differences in human and mouse macrophage nitric oxide production. *J. Neuroimmunol.* 147, 62–67.

Coon, K.D., Myers, A.J., Craig, D.W., Webster, J.A., Pearson, J.V., Lince, D.H., Zismann, V.L., Beach, T.G., Leung, D., Bryden, L., et al. (2007). A high-density whole-genome association study reveals that APOE is the major susceptibility gene for sporadic late-onset Alzheimer's disease. *J. Clin. Psychiatry* *68*, 613–618.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Small, G.W., Roses, A.D., Haines, J.L., and Pericak-Vance, M.A. (1993). Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* *261*, 921–923.

Corder, E.H., Saunders, A.M., Risch, N.J., Strittmatter, W.J., Schmechel, D.E., Gaskell, P.C., Rimmer, J.B., Locke, P.A., Conneally, P.M., and Schmechel, K.E. (1994). Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* *7*, 180–184.

Cotman, C.W., Banker, G., Churchill, L., and Taylor, D. (1974). Isolation of postsynaptic densities from rat brain. *J. Cell Biol.* *63*, 441–455.

Craig, T.J., Evans, G.J.O., and Morgan, A. (2003). Physiological regulation of Munc18/nSec1 phosphorylation on serine-313. *J. Neurochem.* *86*, 1450–1457.

Crehan, H., Hardy, J., and Pocock, J. (2013). Blockage of CR1 prevents activation of rodent microglia. *Neurobiol. Dis.* *54*, 139–149.

Cruts, M., Theuns, J., and Van Broeckhoven, C. (2012). Locus-specific mutation databases for neurodegenerative brain diseases. *Hum. Mutat.* *33*, 1340–1344.

Cull-Candy, S.G., and Leszkiewicz, D.N. (2004). Role of distinct NMDA receptor subtypes at central synapses. *Sci. STKE Signal Transduct. Knowl. Environ.* *2004*, re16.

D'Alessandro, M., Hnia, K., Gache, V., Koch, C., Gavriilidis, C., Rodriguez, D., Nicot, A.-S., Romero, N.B., Schwab, Y., Gomes, E., et al. (2015). Amphiphysin 2 Orchestrates Nucleus Positioning and Shape by Linking the Nuclear Envelope to the Actin and Microtubule Cytoskeleton. *Dev. Cell* *35*, 186–198.

De Ronchi, D., Berardi, D., Menchetti, M., Ferrari, G., Serretti, A., Dalmonte, E., and Fratiglioni, L. (2005). Occurrence of cognitive impairment and dementia after the age of 60: a population-based study from Northern Italy. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* *19*, 97–105.

De Strooper, B., and Karran, E. (2016). The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell* *164*, 603–615.

Di Paolo, G., Sankaranarayanan, S., Wenk, M.R., Daniell, L., Perucco, E., Caldarone, B.J., Flavell, R., Picciotto, M.R., Ryan, T.A., Cremona, O., et al. (2002). Decreased synaptic vesicle recycling efficiency and cognitive deficits in amphiphysin 1 knockout mice. *Neuron* *33*, 789–804.

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

Duff, K., Eckman, C., Zehr, C., Yu, X., Prada, C.M., Perez-tur, J., Hutton, M., Buee, L., Harigaya, Y., Yager, D., et al. (1996). Increased amyloid-β₄₂(43) in brains of mice expressing mutant presenilin 1. *Nature* *383*, 710–713.

Dulubova, I., Sugita, S., Hill, S., Hosaka, M., Fernandez, I., Südhof, T.C., and Rizo, J. (1999). A conformational switch in syntaxin during exocytosis: role of munc18. *EMBO J.* *18*, 4372–4382.

Dumont, M., Strazielle, C., Staufenbiel, M., and Lalonde, R. (2004). Spatial learning and exploration of environmental stimuli in 24-month-old female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res.* *1024*, 113–121.

Duyckaerts, C., Colle, M.A., Dessi, F., Piette, F., and Hauw, J.J. (1998). Progression of Alzheimer histopathological changes. *Acta Neurol. Belg.* *98*, 180–185.

Elosua, R., Ordovas, J.M., Cupples, L.A., Fox, C.S., Polak, J.F., Wolf, P.A., D’Agostino, R.A., and O’Donnell, C.J. (2004). Association of APOE genotype with carotid atherosclerosis in men and women: the Framingham Heart Study. *J. Lipid Res.* *45*, 1868–1875.

Ennaceur, A., and Delacour, J. (1988). A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. *Behav. Brain Res.* *31*, 47–59.

Falcone, S., Roman, W., Hnia, K., Gache, V., Didier, N., Lainé, J., Auradé, F., Marty, I., Nishino, I., Charlet-Berguerand, N., et al. (2014). N-WASP is required for Amphiphysin-2/BIN1-dependent nuclear positioning and triad organization in skeletal muscle and is involved in the pathophysiology of centronuclear myopathy. *EMBO Mol. Med.* *6*, 1455–1475.

Fernando, P., Sandoz, J.S., Ding, W., de Repentigny, Y., Brunette, S., Kelly, J.F., Kothary, R., and Megeney, L.A. (2009). Bin1 SRC homology 3 domain acts as a scaffold for myofiber sarcomere assembly. *J. Biol. Chem.* *284*, 27674–27686.

Ferri, C.P., Prince, M., Brayne, C., Brodaty, H., Fratiglioni, L., Ganguli, M., Hall, K., Hasegawa, K., Hendrie, H., Huang, Y., et al. (2005). Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet* *366*, 2112–2117.

Fesce, R., Grohovaz, F., Valtorta, F., and Meldolesi, J. (1994). Neurotransmitter release: fusion or “kiss-and-run”? *Trends Cell Biol.* *4*, 1–4.

Fitzpatrick, A.L., Kuller, L.H., Ives, D.G., Lopez, O.L., Jagust, W., Breitner, J.C.S., Jones, B., Lyketsos, C., and Dulberg, C. (2004). Incidence and prevalence of dementia in the Cardiovascular Health Study. *J. Am. Geriatr. Soc.* *52*, 195–204.

Foa, L., and Gasperini, R. (2009). Developmental roles for Homer: more than just a pretty scaffold. *J. Neurochem.* *108*, 1–10.

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

Fujita, Y., Sasaki, T., Fukui, K., Kotani, H., Kimura, T., Hata, Y., Südhof, T.C., Scheller, R.H., and Takai, Y. (1996). Phosphorylation of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 by protein kinase C: its implication in regulating the interaction of Munc-18/n-Sec1/rbSec1 with syntaxin. *J. Biol. Chem.* *271*, 7265–7268.

Fuster-Matanzo, A., Llorens-Martín, M., Hernández, F., and Avila, J. (2013). Role of neuroinflammation in adult neurogenesis and Alzheimer disease: therapeutic approaches. *Mediators Inflamm.* *2013*, 260925.

Fyhn, M., Molden, S., Witter, M.P., Moser, E.I., and Moser, M.-B. (2004). Spatial representation in the entorhinal cortex. *Science* 305, 1258–1264.

Gad, H., Ringstad, N., Löw, P., Kjaerulff, O., Gustafsson, J., Wenk, M., Di Paolo, G., Nemoto, Y., Crun, J., Ellisman, M.H., et al. (2000). Fission and uncoating of synaptic clathrin-coated vesicles are perturbed by disruption of interactions with the SH3 domain of endophilin. *Neuron* 27, 301–312.

Gallop, J.L., and McMahon, H.T. (2005). BAR domains and membrane curvature: bringing your curves to the BAR. *Biochem. Soc. Symp.* 223–231.

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

Garcia-Alloza, M., Robbins, E.M., Zhang-Nunes, S.X., Purcell, S.M., Betensky, R.A., Raju, S., Prada, C., Greenberg, S.M., Bacskai, B.J., and Frosch, M.P. (2006). Characterization of amyloid deposition in the APP^{swe}/PS1^{dE9} mouse model of Alzheimer disease. *Neurobiol. Dis.* 24, 516–524.

Ghaneie, A., Zemba-Palko, V., Itoh, H., Itoh, K., Sakamuro, D., Nakamura, S., Soler, A.P., and Prendergast, G.C. (2007). Bin1 attenuation in breast cancer is correlated to nodal metastasis and reduced survival. *Cancer Biol. Ther.* 6, 192–194.

Giannakopoulos, P., Herrmann, F.R., Bussi re, T., Bouras, C., Kovari, E., Perl, D.P., Morrison, J.H., Gold, G., and Hof, P.R. (2003). Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer’s disease. *Neurology* 60, 1495–1500.

Giulian, D. (1999). Microglia and the immune pathology of Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 65, 13–18.

Goate, A., Chartier-Harlin, M.-C., Mullan, M., Brown, J., Crawford, F., Fidani, L., Giuffra, L., Haynes, A., Irving, N., James, L., et al. (1991). Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer’s disease. *Nature* 349, 704–706.

Goldstein, L.S.B. (2012). Axonal transport and neurodegenerative disease: can we see the elephant? *Prog. Neurobiol.* 99, 186–190.

Gomez-Isla, T., West, H.L., Rebeck, G.W., Harr, S.D., Growdon, J.H., Locascio, J.J., Perls, T.T., Lipsitz, L.A., and Hyman, B.T. (1996). Clinical and pathological correlates of apolipoprotein E epsilon 4 in Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 39, 62–70.

Gómez-Isla, T., Hollister, R., West, H., Mui, S., Growdon, J.H., Petersen, R.C., Parisi, J.E., and Hyman, B.T. (1997). Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer’s disease. *Ann. Neurol.* 41, 17–24.

Gomez-Nicola, D., Suzzi, S., Vargas-Caballero, M., Fransen, N.L., Al-Malki, H., Cebrian-Silla, A., Garcia-Verdugo, J.M., Riecken, K., Fehse, B., and Perry, V.H. (2014). Temporal dynamics of hippocampal neurogenesis in chronic neurodegeneration. *Brain J. Neurol.* 137, 2312–2328.

Gracian, E.I., Shelley, L.E., Morris, A.M., and Gilbert, P.E. (2013). Age-related changes in place learning for adjacent and separate locations. *Neurobiol. Aging* 34, 2304–2309.

Griciuc, A., Serrano-Pozo, A., Parrado, A.R., Lesinski, A.N., Asselin, C.N., Mullin, K., Hooli, B., Choi, S.H., Hyman, B.T., and Tanzi, R.E. (2013). Alzheimer's disease risk gene CD33 inhibits microglial uptake of amyloid beta. *Neuron* 78, 631–643.

Guo, L., LaDu, M.J., and Van Eldik, L.J. (2004). A dual role for apolipoprotein e in neuroinflammation: anti- and pro-inflammatory activity. *J. Mol. Neurosci.* MN 23, 205–212.

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

Haditsch, U., Leone, D.P., Farinelli, M., Chrostek-Grashoff, A., Brakebusch, C., Mansuy, I.M., McConnell, S.K., and Palmer, T.D. (2009). A central role for the small GTPase Rac1 in hippocampal plasticity and spatial learning and memory. *Mol. Cell. Neurosci.* 41, 409–419.

Hanger, D.P., Anderton, B.H., and Noble, W. (2009). Tau phosphorylation: the therapeutic challenge for neurodegenerative disease. *Trends Mol. Med.* 15, 112–119.

Hardy, J., Duff, K., Hardy, K.G., Perez-Tur, J., and Hutton, M. (1998). Genetic dissection of Alzheimer's disease and related dementias: amyloid and its relationship to tau. *Nat. Neurosci.* 1, 355–358.

Harold, D., Abraham, R., Hollingworth, P., Sims, R., Gerrish, A., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskva, V., Dowzell, K., Williams, A., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at CLU and PICALM associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 41, 1088–1093.

Harris, K.M., Jensen, F.E., and Tsao, B. (1992). Three-dimensional structure of dendritic spines and synapses in rat hippocampus (CA1) at postnatal day 15 and adult ages: implications for the maturation of synaptic physiology and long-term potentiation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 12, 2685–2705.

Hartman, R.E., Wozniak, D.F., Nardi, A., Olney, J.W., Sartorius, L., and Holtzman, D.M. (2001). Behavioral phenotyping of GFAP-*apoE3* and -*apoE4* transgenic mice: *apoE4* mice show profound working memory impairments in the absence of Alzheimer's-like neuropathology. *Exp. Neurol.* 170, 326–344.

Hata, Y., Slaughter, C.A., and Südhof, T.C. (1993). Synaptic vesicle fusion complex contains *unc-18* homologue bound to syntaxin. *Nature* 366, 347–351.

Hayashi-Takagi, A., Takaki, M., Graziane, N., Seshadri, S., Murdoch, H., Dunlop, A.J., Makino, Y., Seshadri, A.J., Ishizuka, K., Srivastava, D.P., et al. (2010). Disrupted-in-Schizophrenia 1 (DISC1) regulates spines of the glutamate synapse via Rac1. *Nat. Neurosci.* 13, 327–332.

Heber, S., Herms, J., Gajic, V., Hainfellner, J., Aguzzi, A., Rüllicke, T., von Kretschmar, H., von Koch, C., Sisodia, S., Tremml, P., et al. (2000). Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 7951–7963.

Ho, A., Liu, X., and Südhof, T.C. (2008). Deletion of Mint proteins decreases amyloid production in transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 14392–14400.

Holden, H.M. (2012). Spatial pattern separation in cognitively normal young and older adults. *Hippocampus* 22, 1826–1832.

Hollingworth, P., Harold, D., Sims, R., Gerrish, A., Lambert, J.-C., Carrasquillo, M.M., Abraham, R., Hamshere, M.L., Pahwa, J.S., Moskvin, V., et al. (2011). Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* 43, 429–435.

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

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

Hoover, B.R., Reed, M.N., Su, J., Penrod, R.D., Kotilinek, L.A., Grant, M.K., Pitstick, R., Carlson, G.A., Lanier, L.M., Yuan, L.-L., et al. (2010). Tau mislocalization to dendritic spines mediates synaptic dysfunction independently of neurodegeneration. *Neuron* 68, 1067–1081.

Hsiao, K., Chapman, P., Nilsen, S., Eckman, C., Harigaya, Y., Younkin, S., Yang, F., and Cole, G. (1996). Correlative memory deficits, Aβ elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 274, 99–102.

Hu, J., LaDu, M.J., and Van Eldik, L.J. (1998). Apolipoprotein E attenuates beta-amyloid-induced astrocyte activation. *J. Neurochem.* 71, 1626–1634.

Huang, T.Y., Michael, S., Xu, T., Sarkeshik, A., Moresco, J.J., Yates, J.R., Masliah, E., Bokoch, G.M., and DerMardirossian, C. (2013). A novel Rac1 GAP splice variant relays poly-Ub accumulation signals to mediate Rac1 inactivation. *Mol. Biol. Cell* 24, 194–209.

Husain, M. (2014). Big data: could it ever cure Alzheimer's disease? *Brain J. Neurol.* 137, 2623–2624.

Huser, S., Suri, G., Crottet, P., and Spiess, M. (2013). Interaction of amphiphysins with AP-1 clathrin adaptors at the membrane. *Biochem. J.* 450, 73–83.

Husi, H., Ward, M.A., Choudhary, J.S., Blackstock, W.P., and Grant, S.G. (2000). Proteomic analysis of NMDA receptor-adhesion protein signaling complexes. *Nat. Neurosci.* 3, 661–669.

Hutton, M., Lendon, C.L., Rizzu, P., Baker, M., Froelich, S., Houlden, H., Pickering-Brown, S., Chakraverty, S., Isaacs, A., Grover, A., et al. (1998). Association of missense and 5'-splice-site mutations in tau with the inherited dementia FTDP-17. *Nature* 393, 702–705.

Iqbal, K., Alonso, A.D., Gondal, J.A., Gong, C.X., Haque, N., Khatoon, S., Sengupta, A., Wang, J.Z., and Grundke-Iqbal, I. (2000). Mechanism of neurofibrillary degeneration and pharmacologic therapeutic approach. *J. Neural Transm. Suppl.* 59, 213–222.

Israel, M.A., Yuan, S.H., Bardy, C., Reyna, S.M., Mu, Y., Herrera, C., Hefferan, M.P., Van Gorp, S., Nazor, K.L., Boscolo, F.S., et al. (2012). Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482, 216–220.

Ittner, L.M., Ke, Y.D., Delerue, F., Bi, M., Gladbach, A., van Eersel, J., Wölfing, H., Chieng, B.C., Christie, M.J., Napier, I.A., et al. (2010). Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* *142*, 387–397.

Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Ratovitski, T., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Borchelt, D.R. (2001). Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS: a comparison of strategies. *Biomol. Eng.* *17*, 157–165.

Jankowsky, J.L., Slunt, H.H., Gonzales, V., Jenkins, N.A., Copeland, N.G., and Borchelt, D.R. (2004). APP processing and amyloid deposition in mice haplo-insufficient for presenilin 1. *Neurobiol. Aging* *25*, 885–892.

Jaworski, J., Kapitein, L.C., Gouveia, S.M., Dortland, B.R., Wulf, P.S., Grigoriev, I., Camera, P., Spangler, S.A., Di Stefano, P., Demmers, J., et al. (2009). Dynamic microtubules regulate dendritic spine morphology and synaptic plasticity. *Neuron* *61*, 85–100.

Jin, K., Peel, A.L., Mao, X.O., Xie, L., Cottrell, B.A., Henshall, D.C., and Greenberg, D.A. (2004). Increased hippocampal neurogenesis in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 343–347.

Joshi, P., Liang, J.O., DiMonte, K., Sullivan, J., and Pimplikar, S.W. (2009). Amyloid precursor protein is required for convergent-extension movements during Zebrafish development. *Dev. Biol.* *335*, 1–11.

Jurado, S., Goswami, D., Zhang, Y., Molina, A.J.M., Südhof, T.C., and Malenka, R.C. (2013). LTP requires a unique postsynaptic SNARE fusion machinery. *Neuron* *77*, 542–558.

Kamboh, M.I., Demirci, F.Y., Wang, X., Minster, R.L., Carrasquillo, M.M., Pankratz, V.S., Younkin, S.G., Saykin, A.J., Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Jun, G., et al. (2012). Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry* *2*, e117.

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

Kanatsu, K., Morohashi, Y., Suzuki, M., Kuroda, H., Watanabe, T., Tomita, T., and Iwatsubo, T. (2014). Decreased CALM expression reduces A β 42 to total A β ratio through clathrin-mediated endocytosis of γ -secretase. *Nat. Commun.* *5*, 3386.

Kavalali, E.T. (2015). The mechanisms and functions of spontaneous neurotransmitter release. *Nat. Rev. Neurosci.* *16*, 5–16.

Kennedy, M.J., Davison, I.G., Robinson, C.G., and Ehlers, M.D. (2010). Syntaxin-4 defines a domain for activity-dependent exocytosis in dendritic spines. *Cell* *141*, 524–535.

Khan, U.A., Liu, L., Provenzano, F.A., Berman, D.E., Profaci, C.P., Sloan, R., Mayeux, R., Duff, K.E., and Small, S.A. (2014). Molecular drivers and cortical spread of lateral entorhinal cortex dysfunction in preclinical Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* *17*, 304–311.

Kheirbek, M.A., Tannenholz, L., and Hen, R. (2012). NR2B-dependent plasticity of adult-born granule cells is necessary for context discrimination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 8696–8702.

Khvotchev, M., Dulubova, I., Sun, J., Dai, H., Rizo, J., and Südhof, T.C. (2007). Dual modes of Munc18-1/SNARE interactions are coupled by functionally critical binding to syntaxin-1 N terminus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 12147–12155.

Kim, E., and Sheng, M. (2004). PDZ domain proteins of synapses. *Nat. Rev. Neurosci.* *5*, 771–781.

Kiraly, D.D., Lemtiri-Chlieh, F., Levine, E.S., Mains, R.E., and Eipper, B.A. (2011). Kalirin Binds the NR2B Subunit of the NMDA Receptor, Altering Its Synaptic Localization and Function. *J. Neurosci.* *31*, 12554–12565.

Kitaguchi, N., Takahashi, Y., Tokushima, Y., Shiojiri, S., and Ito, H. (1988). Novel precursor of Alzheimer's disease amyloid protein shows protease inhibitory activity. *Nature* *331*, 530–532.

Knafo, S., Venero, C., Merino-Serrais, P., Feraud-Espinosa, I., Gonzalez-Soriano, J., Ferrer, I., Santpere, G., and DeFelipe, J. (2009). Morphological alterations to neurons of the amygdala and impaired fear conditioning in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Pathol.* *219*, 41–51.

Knierim, J.J. (2015). The hippocampus. *Curr. Biol.* *25*, R1116–R1121.

von Koch, C.S., Zheng, H., Chen, H., Trumbauer, M., Thinakaran, G., van der Ploeg, L.H., Price, D.L., and Sisodia, S.S. (1997). Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol. Aging* *18*, 661–669.

Köhr, G. (2006). NMDA receptor function: subunit composition versus spatial distribution. *Cell Tissue Res.* *326*, 439–446.

Kononenko, N.L., and Haucke, V. (2015). Molecular mechanisms of presynaptic membrane retrieval and synaptic vesicle reformation. *Neuron* *85*, 484–496.

Kornau, H.C., Schenker, L.T., Kennedy, M.B., and Seeburg, P.H. (1995). Domain interaction between NMDA receptor subunits and the postsynaptic density protein PSD-95. *Science* *269*, 1737–1740.

LaDu, M.J., Shah, J.A., Reardon, C.A., Getz, G.S., Bu, G., Hu, J., Guo, L., and van Eldik, L.J. (2000). Apolipoprotein E receptors mediate the effects of beta-amyloid on astrocyte cultures. *J. Biol. Chem.* *275*, 33974–33980.

LaDu, M.J., Shah, J.A., Reardon, C.A., Getz, G.S., Bu, G., Hu, J., Guo, L., and Van Eldik, L.J. (2001). Apolipoprotein E and apolipoprotein E receptors modulate A beta-induced glial neuroinflammatory responses. *Neurochem. Int.* *39*, 427–434.

Lalonde, R., Dumont, M., Staufenbiel, M., Sturchler-Pierrat, C., and Strazielle, C. (2002). Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation. *Brain Res.* *956*, 36–44.

Lambert, J.-C., Heath, S., Even, G., Campion, D., Sleegers, K., Hiltunen, M., Combarros, O., Zelenika, D., Bullido, M.J., Tavernier, B., et al. (2009). Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *CR1* associated with Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *41*, 1094–1099.

Lambert, J.C., Ibrahim-Verbaas, C.A., Harold, D., Naj, A.C., Sims, R., Bellenguez, C., DeStafano, A.L., Bis, J.C., Beecham, G.W., Grenier-Boley, B., et al. (2013). Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *45*, 1452–1458.

Lee, J.-H., Lau, K.-F., Perkinson, M.S., Standen, C.L., Rogelj, B., Falinska, A., McLoughlin, D.M., and Miller, C.C.J. (2004). The neuronal adaptor protein X11beta reduces amyloid beta-protein levels and amyloid plaque formation in the brains of transgenic mice. *J. Biol. Chem.* 279, 49099–49104.

Lee, S.H., Liu, L., Wang, Y.T., and Sheng, M. (2002). Clathrin adaptor AP2 and NSF interact with overlapping sites of GluR2 and play distinct roles in AMPA receptor trafficking and hippocampal LTD. *Neuron* 36, 661–674.

Lehéricy, S., and Marsault, C. (2005). Les troubles de la mémoire dans la maladie d'Alzheimer: l'apport de l'imagerie cérébrale structurale. *Troubl. Mém. Dans Malaie Alzheimer*.

Leprince, C., Romero, F., Cussac, D., Vayssiere, B., Berger, R., Tavitian, A., and Camonis, J.H. (1997). A new member of the amphiphysin family connecting endocytosis and signal transduction pathways. *J. Biol. Chem.* 272, 15101–15105.

Leprince, C., Le Scolan, E., Meunier, B., Fraissier, V., Brandon, N., De Gunzburg, J., and Camonis, J. (2003). Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J. Cell Sci.* 116, 1937–1948.

Li, B., Yamamori, H., Tatebayashi, Y., Shafit-Zagardo, B., Tanimukai, H., Chen, S., Iqbal, K., and Grundke-Iqbal, I. (2008). Failure of neuronal maturation in Alzheimer disease dentate gyrus. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67, 78–84.

Li, G., Bien-Ly, N., Andrews-Zwilling, Y., Xu, Q., Bernardo, A., Ring, K., Halabisky, B., Deng, C., Mahley, R.W., and Huang, Y. (2009). GABAergic Interneuron Dysfunction Impairs Hippocampal Neurogenesis in Adult Apolipoprotein E4 Knockin Mice. *Cell Stem Cell* 5, 634–645.

Li, J.-Q., Wang, H.-F., Zhu, X.-C., Sun, F.-R., Tan, M.-S., Tan, C.-C., Jiang, T., Tan, L., Yu, J.-T., and Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2016). GWAS-Linked Loci and Neuroimaging Measures in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.*

Lilja, L., Johansson, J.U., Gromada, J., Mandic, S.A., Fried, G., Berggren, P.-O., and Bark, C. (2004). Cyclin-dependent kinase 5 associated with p39 promotes Munc18-1 phosphorylation and Ca(2+)-dependent exocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 29534–29541.

Ling, D.S.F., Benardo, L.S., Serrano, P.A., Blace, N., Kelly, M.T., Crary, J.F., and Sacktor, T.C. (2002). Protein kinase Mzeta is necessary and sufficient for LTP maintenance. *Nat. Neurosci.* 5, 295–296.

Lisman, J., Yasuda, R., and Raghavachari, S. (2012). Mechanisms of CaMKII action in long-term potentiation. *Nat. Rev. Neurosci.* 13, 169–182.

Liu, J., Ernst, S.A., Gladychева, S.E., Lee, Y.Y.F., Lentz, S.I., Ho, C.S., Li, Q., and Stuenkel, E.L. (2004). Fluorescence resonance energy transfer reports properties of syntaxin1a interaction with Munc18-1 in vivo. *J. Biol. Chem.* 279, 55924–55936.

Lledo, P.M., Zhang, X., Südhof, T.C., Malenka, R.C., and Nicoll, R.A. (1998). Postsynaptic membrane fusion and long-term potentiation. *Science* 279, 399–403.

Lobo, A., Launer, L.J., Fratiglioni, L., Andersen, K., Di Carlo, A., Breteler, M.M., Copeland, J.R., Dartigues, J.F., Jagger, C., Martinez-Lage, J., et al. (2000). Prevalence of dementia and major subtypes in Europe: A collaborative study of population-based cohorts. Neurologic Diseases in the Elderly Research Group. *Neurology* 54, S4-9.

Lu, H.E., MacGillavry, H.D., Frost, N.A., and Blanpied, T.A. (2014). Multiple spatial and kinetic subpopulations of CaMKII in spines and dendrites as resolved by single-molecule tracking PALM. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 7600–7610.

Lu, W., Man, H., Ju, W., Trimble, W.S., MacDonald, J.F., and Wang, Y.T. (2001). Activation of synaptic NMDA receptors induces membrane insertion of new AMPA receptors and LTP in cultured hippocampal neurons. *Neuron* *29*, 243–254.

Lucin, K.M., O'Brien, C.E., Bieri, G., Czirr, E., Mosher, K.I., Abbey, R.J., Mastroeni, D.F., Rogers, J., Spencer, B., Masliah, E., et al. (2013). Microglial beclin 1 regulates retromer trafficking and phagocytosis and is impaired in Alzheimer's disease. *Neuron* *79*, 873–886.

Lue, L.F., Kuo, Y.M., Roher, A.E., Brachova, L., Shen, Y., Sue, L., Beach, T., Kurth, J.H., Rydel, R.E., and Rogers, J. (1999). Soluble amyloid beta peptide concentration as a predictor of synaptic change in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* *155*, 853–862.

Lynch, G., Larson, J., Kelso, S., Barrionuevo, G., and Schottler, F. (1983). Intracellular injections of EGTA block induction of hippocampal long-term potentiation. *Nature* *305*, 719–721.

Lynch, J.R., Tang, W., Wang, H., Vitek, M.P., Bennett, E.R., Sullivan, P.M., Warner, D.S., and Laskowitz, D.T. (2003). APOE genotype and an ApoE-mimetic peptide modify the systemic and central nervous system inflammatory response. *J. Biol. Chem.* *278*, 48529–48533.

Ma, C., Li, W., Xu, Y., and Rizo, J. (2011). Munc13 mediates the transition from the closed syntaxin-Munc18 complex to the SNARE complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 542–549.

Magara, F., Müller, U., Li, Z.W., Lipp, H.P., Weissmann, C., Stagljar, M., and Wolfer, D.P. (1999). Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the beta-amyloid-precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *96*, 4656–4661.

Mahley, R.W., Weisgraber, K.H., and Huang, Y. (2006). Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5644–5651.

Malchiodi-Albedi, F., Domenici, M.R., Paradisi, S., Bernardo, A., Ajmone-Cat, M.A., and Minghetti, L. (2001). Astrocytes contribute to neuronal impairment in beta A toxicity increasing apoptosis in rat hippocampal neurons. *Glia* *34*, 68–72.

Malenka, R.C., Kauer, J.A., Perkel, D.J., Mauk, M.D., Kelly, P.T., Nicoll, R.A., and Waxham, M.N. (1989). An essential role for postsynaptic calmodulin and protein kinase activity in long-term potentiation. *Nature* *340*, 554–557.

Man, H.-Y., Wang, Q., Lu, W.-Y., Ju, W., Ahmadian, G., Liu, L., D'Souza, S., Wong, T.P., Taghibiglou, C., Lu, J., et al. (2003). Activation of PI3-kinase is required for AMPA receptor insertion during LTP of mEPSCs in cultured hippocampal neurons. *Neuron* *38*, 611–624.

Mayeux, R., and Stern, Y. (2012). Epidemiology of Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* *2*, a006239.

Merriam, E.B., Millette, M., Lombard, D.C., Saengsawang, W., Fothergill, T., Hu, X., Ferhat, L., and Dent, E.W. (2013). Synaptic Regulation of Microtubule Dynamics in Dendritic Spines by Calcium, F-Actin, and Drebrin. *J. Neurosci.* *33*, 16471–16482.

Meunier, B., Quaranta, M., Daviet, L., Hatzoglou, A., and Leprince, C. (2009). The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *Eur. J. Cell Biol.* *88*, 91–102.

Michel, C.H., Kumar, S., Pinotsi, D., Tunnacliffe, A., St George-Hyslop, P., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., Kaminski, C.F., and Kaminski Schierle, G.S. (2014). Extracellular monomeric tau protein is sufficient to initiate the spread of tau protein pathology. *J. Biol. Chem.* *289*, 956–967.

Moreno, H., Wu, W.E., Lee, T., Brickman, A., Mayeux, R., Brown, T.R., and Small, S.A. (2007). Imaging the Abeta-related neurotoxicity of Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* *64*, 1467–1477.

Moreno, H., Choi, S., Yu, E., Brusco, J., Avila, J., Moreira, J.E., Sugimori, M., and Llinás, R.R. (2011). Blocking Effects of Human Tau on Squid Giant Synapse Transmission and Its Prevention by T-817 MA. *Front. Synaptic Neurosci.* *3*, 3.

Mosconi, L. (2005). Brain glucose metabolism in the early and specific diagnosis of Alzheimer's disease. FDG-PET studies in MCI and AD. *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging* *32*, 486–510.

Mucke, L., Masliah, E., Yu, G.Q., Mallory, M., Rockenstein, E.M., Tatsuno, G., Hu, K., Kholodenko, D., Johnson-Wood, K., and McConlogue, L. (2000). High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *20*, 4050–4058.

Muratore, C.R., Rice, H.C., Srikanth, P., Callahan, D.G., Shin, T., Benjamin, L.N.P., Walsh, D.M., Selkoe, D.J., and Young-Pearse, T.L. (2014). The familial Alzheimer's disease APPV717I mutation alters APP processing and Tau expression in iPSC-derived neurons. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 3523–3536.

Murrell, J., Farlow, M., Ghetti, B., and Benson, M.D. (1991). A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* *254*, 97–99.

Nägerl, U.V., Eberhorn, N., Cambridge, S.B., and Bonhoeffer, T. (2004). Bidirectional activity-dependent morphological plasticity in hippocampal neurons. *Neuron* *44*, 759–767.

Naj, A.C., Jun, G., Beecham, G.W., Wang, L.-S., Vardarajan, B.N., Buross, J., Gallins, P.J., Buxbaum, J.D., Jarvik, G.P., Crane, P.K., et al. (2011). Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* *43*, 436–441.

Namba, Y., Tomonaga, M., Kawasaki, H., Otomo, E., and Ikeda, K. (1991). Apolipoprotein E immunoreactivity in cerebral amyloid deposits and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and kuru plaque amyloid in Creutzfeldt-Jakob disease. *Brain Res.* *541*, 163–166.

Näslund, J., Haroutunian, V., Mohs, R., Davis, K.L., Davies, P., Greengard, P., and Buxbaum, J.D. (2000). Correlation between elevated levels of amyloid beta-peptide in the brain and cognitive decline. *JAMA* *283*, 1571–1577.

Nickerson, D.A., Taylor, S.L., Fullerton, S.M., Weiss, K.M., Clark, A.G., Stengård, J.H., Salomaa, V., Boerwinkle, E., and Sing, C.F. (2000). Sequence diversity and large-scale typing of SNPs in the human apolipoprotein E gene. *Genome Res.* *10*, 1532–1545.

Nowak, L., Bregestovski, P., Ascher, P., Herbet, A., and Prochiantz, A. (1984). Magnesium gates glutamate-activated channels in mouse central neurones. *Nature* *307*, 462–465.

Oakley, H., Cole, S.L., Logan, S., Maus, E., Shao, P., Craft, J., Guillozet-Bongaarts, A., Ohno, M., Disterhoft, J., Eldik, L.V., et al. (2006). Intraneuronal β -Amyloid Aggregates, Neurodegeneration, and Neuron Loss in Transgenic Mice with Five Familial Alzheimer's Disease Mutations: Potential Factors in Amyloid Plaque Formation. *J. Neurosci.* *26*, 10129–10140.

Oddo, S., Caccamo, A., Kitazawa, M., Tseng, B.P., and LaFerla, F.M. (2003). Amyloid deposition precedes tangle formation in a triple transgenic model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* *24*, 1063–1070.

Ohno, M., Chang, L., Tseng, W., Oakley, H., Citron, M., Klein, W.L., Vassar, R., and Disterhoft, J.F. (2006). Temporal memory deficits in Alzheimer's mouse models: rescue by genetic deletion of BACE1. *Eur. J. Neurosci.* *23*, 251–260.

Okamoto, M., Schoch, S., and Südhof, T.C. (1999). ESH1/intersectin, a protein that contains EH and SH3 domains and binds to dynamin and SNAP-25. A protein connection between exocytosis and endocytosis? *J. Biol. Chem.* *274*, 18446–18454.

Ott, M.O., and Bullock, S.L. (2001). A gene trap insertion reveals that amyloid precursor protein expression is a very early event in murine embryogenesis. *Dev. Genes Evol.* *211*, 355–357.

Owen, D.J., Wigge, P., Vallis, Y., Moore, J.D., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (1998). Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J.* *17*, 5273–5285.

Perry, E.K., Johnson, M., Ekonomou, A., Perry, R.H., Ballard, C., and Attems, J. (2012). Neurogenic abnormalities in Alzheimer's disease differ between stages of neurogenesis and are partly related to cholinergic pathology. *Neurobiol. Dis.* *47*, 155–162.

Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T. (2004). BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* *303*, 495–499.

Picas, L., Viaud, J., Schauer, K., Vanni, S., Hnia, K., Fraissier, V., Roux, A., Bassereau, P., Gaits-Iacovoni, F., Payrastre, B., et al. (2014). BIN1/M-Amphiphysin2 induces clustering of phosphoinositides to recruit its downstream partner dynamin. *Nat. Commun.* *5*, 5647.

Pike, C.J., Walencewicz, A.J., Glabe, C.G., and Cotman, C.W. (1991). Aggregation-related toxicity of synthetic beta-amyloid protein in hippocampal cultures. *Eur. J. Pharmacol.* *207*, 367–368.

Pike, C.J., Cummings, B.J., and Cotman, C.W. (1992). beta-Amyloid induces neuritic dystrophy in vitro: similarities with Alzheimer pathology. *Neuroreport* *3*, 769–772.

Polydoro, M., Dzhala, V.I., Pooler, A.M., Nicholls, S.B., McKinney, A.P., Sanchez, L., Pitstick, R., Carlson, G.A., Staley, K.J., Spires-Jones, T.L., et al. (2014). Soluble pathological tau in the entorhinal cortex leads to presynaptic deficits in an early Alzheimer's disease model. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 127, 257–270.

Pozueta, J., Lefort, R., and Shelanski, M.L. (2013). Synaptic changes in Alzheimer's disease and its models. *Neuroscience* 251, 51–65.

Prokic, I., Cowling, B.S., and Laporte, J. (2014). Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J. Mol. Med. Berl. Ger.*

Prut, L., Abramowski, D., Krucker, T., Levy, C.L., Roberts, A.J., Staufenbiel, M., and Wiessner, C. (2007). Aged APP23 mice show a delay in switching to the use of a strategy in the Barnes maze. *Behav. Brain Res.* 179, 107–110.

Puig, K.L., and Combs, C.K. (2013). Expression and function of APP and its metabolites outside the central nervous system. *Exp. Gerontol.* 48, 608–611.

Pyndiah, S., Tanida, S., Ahmed, K.M., Cassimere, E.K., Choe, C., and Sakamuro, D. (2011). c-MYC suppresses BIN1 to release poly(ADP-ribose) polymerase 1: a mechanism by which cancer cells acquire cisplatin resistance. *Sci. Signal.* 4, ra19.

Qualmann, B., Koch, D., and Kessels, M.M. (2011). Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *EMBO J.* 30, 3501–3515.

Querfurth, H.W., and LaFerla, F.M. (2010). Alzheimer's disease. *N. Engl. J. Med.* 362, 329–344.

Raber, J., Akana, S.F., Bhatnagar, S., Dallman, M.F., Wong, D., and Mucke, L. (2000a). Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in Apoe(-/-) mice: possible role in behavioral and metabolic alterations. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 20, 2064–2071.

Raber, J., Wong, D., Yu, G.Q., Buttini, M., Mahley, R.W., Pitas, R.E., and Mucke, L. (2000b). Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* 404, 352–354.

Ramaroson, H., Helmer, C., Barberger-Gateau, P., Letenneur, L., Dartigues, J.-F., and PAQUID (2003). [Prevalence of dementia and Alzheimer's disease among subjects aged 75 years or over: updated results of the PAQUID cohort]. *Rev. Neurol. (Paris)* 159, 405–411.

Ramjaun, A.R., Micheva, K.D., Bouchelet, I., and McPherson, P.S. (1997). Identification and characterization of a nerve terminal-enriched amphiphysin isoform. *J. Biol. Chem.* 272, 16700–16706.

Rapoport, M., Dawson, H.N., Binder, L.I., Vitek, M.P., and Ferreira, A. (2002). Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 6364–6369.

Reiman, E.M., Quiroz, Y.T., Fleisher, A.S., Chen, K., Velez-Pardo, C., Jimenez-Del-Rio, M., Fagan, A.M., Shah, A.R., Alvarez, S., Arbelaez, A., et al. (2012). Brain imaging and fluid biomarker analysis in young adults at genetic risk for autosomal dominant Alzheimer's disease in the presenilin 1 E280A kindred: a case-control study. *Lancet Neurol.* 11, 1048–1056.

Reiserer, R.S., Harrison, F.E., Syverud, D.C., and McDonald, M.P. (2007). Impaired spatial learning in the APPSwe + PSEN1DeltaE9 bigenic mouse model of Alzheimer's disease. *Genes Brain Behav.* 6, 54–65.

Ren, G., Vajjhala, P., Lee, J.S., Winsor, B., and Munn, A.L. (2006). The BAR domain proteins: molding membranes in fission, fusion, and phagy. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* MMBR 70, 37–120.

Renner, M., Specht, C.G., and Triller, A. (2008). Molecular dynamics of postsynaptic receptors and scaffold proteins. *Curr. Opin. Neurobiol.* 18, 532–540.

Rhinn, H., Fujita, R., Qiang, L., Cheng, R., Lee, J.H., and Abeliovich, A. (2013). Integrative genomics identifies APOE ϵ 4 effectors in Alzheimer's disease. *Nature* 500, 45–50.

Ringstad, N., Gad, H., Löw, P., Di Paolo, G., Brodin, L., Shupliakov, O., and De Camilli, P. (1999). Endophilin/SH3p4 is required for the transition from early to late stages in clathrin-mediated synaptic vesicle endocytosis. *Neuron* 24, 143–154.

Rizzoli, S.O., and Betz, W.J. (2005). Synaptic vesicle pools. *Nat. Rev. Neurosci.* 6, 57–69.

Roberson, E.D., Scarce-Levie, K., Palop, J.J., Yan, F., Cheng, I.H., Wu, T., Gerstein, H., Yu, G.-Q., and Mucke, L. (2007). Reducing endogenous tau ameliorates amyloid beta-induced deficits in an Alzheimer's disease mouse model. *Science* 316, 750–754.

Rooke, K., Talbot, C., James, L., Anand, R., Hardy, J.A., and Goate, A.M. (1993). A physical map of the human APP gene in YACs. *Mamm. Genome* 4, 662–669.

Roses, A.D. (1996). Apolipoprotein E alleles as risk factors in Alzheimer's disease. *Annu. Rev. Med.* 47, 387–400.

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

Sabatini, B.L., and Regehr, W.G. (1996). Timing of neurotransmission at fast synapses in the mammalian brain. *Nature* 384, 170–172.

Saito, T., Matsuba, Y., Mihira, N., Takano, J., Nilsson, P., Itohara, S., Iwata, N., and Saido, T.C. (2014). Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 17, 661–663.

Sakae, N., Liu, C.-C., Shinohara, M., Frisch-Daiello, J., Ma, L., Yamazaki, Y., Tachibana, M., Younkin, L., Kurti, A., Carrasquillo, M.M., et al. (2016). ABCA7 Deficiency Accelerates Amyloid- β Generation and Alzheimer's Neuronal Pathology. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 36, 3848–3859.

Sakamuro, D., Elliott, K.J., Wechsler-Reya, R., and Prendergast, G.C. (1996). BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat. Genet.* 14, 69–77.

Salvatico, C., Specht, C.G., and Triller, A. (2015). Synaptic receptor dynamics: from theoretical concepts to deep quantification and chemistry in cellulo. *Neuropharmacology* 88, 2–9.

- Sano, Y., Syuzo-Takabatake, A., Nakaya, T., Saito, Y., Tomita, S., Itohara, S., and Suzuki, T. (2006). Enhanced amyloidogenic metabolism of the amyloid beta-protein precursor in the X11L-deficient mouse brain. *J. Biol. Chem.* *281*, 37853–37860.
- Santacruz, K., Lewis, J., Spire, T., Paulson, J., Kotilinek, L., Ingelsson, M., Guimaraes, A., DeTure, M., Ramsden, M., McGowan, E., et al. (2005). Tau suppression in a neurodegenerative mouse model improves memory function. *Science* *309*, 476–481.
- Satizabal, C.L., Beiser, A.S., Chouraki, V., Chêne, G., Dufouil, C., and Seshadri, S. (2016). Incidence of Dementia over Three Decades in the Framingham Heart Study. *N. Engl. J. Med.* *374*, 523–532.
- Schubert, W., Prior, R., Weidemann, A., Dirksen, H., Multhaup, G., Masters, C.L., and Beyreuther, K. (1991). Localization of Alzheimer beta A4 amyloid precursor protein at central and peripheral synaptic sites. *Brain Res.* *563*, 184–194.
- Seab, J.P., Jagust, W.J., Wong, S.T.S., Roos, M.S., Reed, B.R., and Budinger, T.F. (1988). Quantitative NMR measurements of hippocampal atrophy in Alzheimer's disease. *Magn. Reson. Med.* *8*, 200–208.
- Selkoe (2002). Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* *298*, 789–791.
- Selkoe, D.J. (1991). The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* *6*, 487–498.
- Seshadri, S., Fitzpatrick, A.L., Ikram, M.A., DeStefano, A.L., Gudnason, V., Boada, M., Bis, J.C., Smith, A.V., Carassquillo, M.M., Lambert, J.C., et al. (2010). Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease. *JAMA* *303*, 1832–1840.
- Seubert, P., Vigo-Pelfrey, C., Esch, F., Lee, M., Dovey, H., Davis, D., Sinha, S., Schlossmacher, M., Whaley, J., and Swindlehurst, C. (1992). Isolation and quantification of soluble Alzheimer's beta-peptide from biological fluids. *Nature* *359*, 325–327.
- Sheng, M., and Hoogenraad, C.C. (2007). The postsynaptic architecture of excitatory synapses: a more quantitative view. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 823–847.
- Small, S.A. (2004). Imaging correlates of brain function in monkeys and rats isolates a hippocampal subregion differentially vulnerable to aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 7181–7186.
- Small, D.H., Mok, S.S., and Bornstein, J.C. (2001). Alzheimer's disease and Abeta toxicity: from top to bottom. *Nat. Rev. Neurosci.* *2*, 595–598.
- Small, S.A., Tsai, W.Y., DeLaPaz, R., Mayeux, R., and Stern, Y. (2002). Imaging hippocampal function across the human life span: is memory decline normal or not? *Ann. Neurol.* *51*, 290–295.
- Small, S.A., Kent, K., Pierce, A., Leung, C., Kang, M.S., Okada, H., Honig, L., Vonsattel, J.-P., and Kim, T.-W. (2005). Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* *58*, 909–919.
- Smith, M.A., Rottkamp, C.A., Nunomura, A., Raina, A.K., and Perry, G. (2000). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Biochim. Biophys. Acta* *1502*, 139–144.
- Snow, A.D., and Wight, T.N. (1989). Proteoglycans in the pathogenesis of Alzheimer's disease and other amyloidoses. *Neurobiol. Aging* *10*, 481–497.

- Snyder, E.M., Nong, Y., Almeida, C.G., Paul, S., Moran, T., Choi, E.Y., Nairn, A.C., Salter, M.W., Lombroso, P.J., Gouras, G.K., et al. (2005). Regulation of NMDA receptor trafficking by amyloid- β . *Nat. Neurosci.* 8, 1051–1058.
- Söllner, T., Bennett, M.K., Whiteheart, S.W., Scheller, R.H., and Rothman, J.E. (1993). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. *Cell* 75, 409–418.
- Song, Y., Stampfer, M.J., and Liu, S. (2004). Meta-analysis: apolipoprotein E genotypes and risk for coronary heart disease. *Ann. Intern. Med.* 141, 137–147.
- Sotiropoulos, I., Catania, C., Riedemann, T., Fry, J.P., Breen, K.C., Michaelidis, T.M., and Almeida, O.F.X. (2008). Glucocorticoids trigger Alzheimer disease-like pathobiochemistry in rat neuronal cells expressing human tau. *J. Neurochem.* 107, 385–397.
- Sottejeau, Y., Bretteville, A., Cantrelle, F.-X., Malmanche, N., Demiaute, F., Mendes, T., Delay, C., Alves Dos Alves, H., Flaig, A., Davies, P., et al. (2015). Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain. *Acta Neuropathol. Commun.* 3, 58.
- Spacek, J., and Harris, K.M. (1998). Three-dimensional organization of cell adhesion junctions at synapses and dendritic spines in area CA1 of the rat hippocampus. *J. Comp. Neurol.* 393, 58–68.
- Spence, E.F., and Soderling, S.H. (2015). Actin Out: Regulation of the Synaptic Cytoskeleton. *J. Biol. Chem.* 290, 28613–28622.
- Sperling, R.A., Aisen, P.S., Beckett, L.A., Bennett, D.A., Craft, S., Fagan, A.M., Iwatsubo, T., Jack, C.R., Kaye, J., Montine, T.J., et al. (2011). Toward defining the preclinical stages of Alzheimer's disease: recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association workgroups on diagnostic guidelines for Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement. J. Alzheimers Assoc.* 7, 280–292.
- Spires-Jones, T.L., Stoothoff, W.H., de Calignon, A., Jones, P.B., and Hyman, B.T. (2009). Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci.* 32, 150–159.
- Strittmatter, W.J., Saunders, A.M., Schmechel, D., Pericak-Vance, M., Enghild, J., Salvesen, G.S., and Roses, A.D. (1993a). 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.
- Strittmatter, W.J., Weisgraber, K.H., Huang, D.Y., Dong, L.M., Salvesen, G.S., Pericak-Vance, M., Schmechel, D., Saunders, A.M., Goldgaber, D., and Roses, A.D. (1993b). Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90, 8098–8102.
- Strooper, B.D., Iwatsubo, T., and Wolfe, M.S. (2012). Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2, a006304.
- Sturchler-Pierrat, C., Abramowski, D., Duke, M., Wiederhold, K.H., Mistl, C., Rothacher, S., Ledermann, B., Bürki, K., Frey, P., Paganetti, P.A., et al. (1997). Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 13287–13292.
- Südhof, T.C. (2012). The Presynaptic Active Zone. *Neuron* 75, 11–25.

Sun, X., Beglopoulos, V., Mattson, M.P., and Shen, J. (2005). Hippocampal spatial memory impairments caused by the familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 M146V mutation. *Neurodegener. Dis.* 2, 6–15.

Sun, X., Chen, W.-D., and Wang, Y.-D. (2015). β -Amyloid: the key peptide in the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Front. Pharmacol.* 6, 221.

Swiech, L., Blazejczyk, M., Urbanska, M., Pietruszka, P., Dortland, B.R., Malik, A.R., Wulf, P.S., Hoogenraad, C.C., and Jaworski, J. (2011). CLIP-170 and IQGAP1 cooperatively regulate dendrite morphology. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 31, 4555–4568.

Tan, M.-S., Yu, J.-T., and Tan, L. (2013). Bridging integrator 1 (BIN1): form, function, and Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 19, 594–603.

Taru, H., and Suzuki, T. (2004). Facilitation of stress-induced phosphorylation of beta-amyloid precursor protein family members by X11-like/Mint2 protein. *J. Biol. Chem.* 279, 21628–21636.

Taupin, P. (2009). Adult neurogenesis, neural stem cells and Alzheimer's disease: developments, limitations, problems and promises. *Curr. Alzheimer Res.* 6, 461–470.

Thomas, J.B., Brier, M.R., Bateman, R.J., Snyder, A.Z., Benzinger, T.L., Xiong, C., Raichle, M., Holtzman, D.M., Sperling, R.A., Mayeux, R., et al. (2014). Functional connectivity in autosomal dominant and late-onset Alzheimer disease. *JAMA Neurol.* 71, 1111–1122.

Tiraboschi, P., Hansen, L.A., Masliah, E., Alford, M., Thal, L.J., and Corey-Bloom, J. (2004). Impact of APOE genotype on neuropathologic and neurochemical markers of Alzheimer disease. *Neurology* 62, 1977–1983.

Tolias, K.F., Duman, J.G., and Um, K. (2011). Control of synapse development and plasticity by Rho GTPase regulatory proteins. *Prog. Neurobiol.* 94, 133–148.

Tomiyama, T. (2010). [Involvement of beta-amyloid in the etiology of Alzheimer's disease]. *Brain Nerve Shinkei Kenkyū No Shinpo* 62, 691–699.

Tomlinson, B.E., Blessed, G., and Roth, M. (1970). Observations on the brains of demented old people. *J. Neurol. Sci.* 11, 205–242.

Traer, C.J., Rutherford, A.C., Palmer, K.J., Wassmer, T., Oakley, J., Attar, N., Carlton, J.G., Kremerskothen, J., Stephens, D.J., and Cullen, P.J. (2007). SNX4 coordinates endosomal sorting of TfnR with dynein-mediated transport into the endocytic recycling compartment. *Nat. Cell Biol.* 9, 1370–1380.

Tsao, A., Moser, M.-B., and Moser, E.I. (2013). Traces of experience in the lateral entorhinal cortex. *Curr. Biol. CB* 23, 399–405.

Tyan, S.-H., Shih, A.Y.-J., Walsh, J.J., Maruyama, H., Sarsoza, F., Ku, L., Eggert, S., Hof, P.R., Koo, E.H., and Dickstein, D.L. (2012). Amyloid precursor protein (APP) regulates synaptic structure and function. *Mol. Cell. Neurosci.* 51, 43–52.

Van der Jeugd, A., Hochgräfe, K., Ahmed, T., Decker, J.M., Sydow, A., Hofmann, A., Wu, D., Messing, L., Balschun, D., D'Hooge, R., et al. (2012). Cognitive defects are reversible in inducible mice expressing pro-aggregant full-length human Tau. *Acta Neuropathol. (Berl.)* 123, 787–805.

Verbeek, M.M., Otte-Höller, I., Westphal, J.R., Wesseling, P., Ruiters, D.J., and de Waal, R.M. (1994). Accumulation of intercellular adhesion molecule-1 in senile plaques in brain tissue of patients with Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 144, 104–116.

Verbeek, M.M., Otte-Höller, I., Franssen, J.A.M., and de Waal, R.M.W. (2002). Accumulation of the amyloid-beta precursor protein in multivesicular body-like organelles. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 50, 681–690.

Villemagne, V.L., Ataka, S., Mizuno, T., Brooks, W.S., Wada, Y., Kondo, M., Jones, G., Watanabe, Y., Mulligan, R., Nakagawa, M., et al. (2009). High striatal amyloid beta-peptide deposition across different autosomal Alzheimer disease mutation types. *Arch. Neurol.* 66, 1537–1544.

Vivot, A., Glymour, M.M., Tzourio, C., Amouyel, P., Chêne, G., and Dufouil, C. (2015). Association of Alzheimer's related genotypes with cognitive decline in multiple domains: results from the Three-City Dijon study. *Mol. Psychiatry*.

Waldau, B., and Shetty, A.K. (2008). Behavior of neural stem cells in the Alzheimer brain. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* 65, 2372–2384.

Walsh, D.M., Klyubin, I., Fadeeva, J.V., Cullen, W.K., Anwyl, R., Wolfe, M.S., Rowan, M.J., and Selkoe, D.J. (2002). Naturally secreted oligomers of amyloid beta protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation in vivo. *Nature* 416, 535–539.

Webster, S.J., Bachstetter, A.D., Nelson, P.T., Schmitt, F.A., and Van Eldik, L.J. (2014). Using mice to model Alzheimer's dementia: an overview of the clinical disease and the preclinical behavioral changes in 10 mouse models. *Front. Genet.* 5, 88.

Wechsler-Reya, R., Sakamuro, D., Zhang, J., Duhadaway, J., and Prendergast, G.C. (1997a). Structural analysis of the human BIN1 gene. Evidence for tissue-specific transcriptional regulation and alternate RNA splicing. *J. Biol. Chem.* 272, 31453–31458.

Wechsler-Reya, R., Elliott, K., Herlyn, M., and Prendergast, G.C. (1997b). The putative tumor suppressor BIN1 is a short-lived nuclear phosphoprotein, the localization of which is altered in malignant cells. *Cancer Res.* 57, 3258–3263.

van Weering, J.R.T., Verkade, P., and Cullen, P.J. (2012). SNX-BAR-mediated endosome tubulation is co-ordinated with endosome maturation. *Traffic Cph. Den.* 13, 94–107.

Wegner, A.M., Nebhan, C.A., Hu, L., Majumdar, D., Meier, K.M., Weaver, A.M., and Webb, D.J. (2008). N-wasp and the arp2/3 complex are critical regulators of actin in the development of dendritic spines and synapses. *J. Biol. Chem.* 283, 15912–15920.

West, M.J. (1993). Regionally specific loss of neurons in the aging human hippocampus. *Neurobiol. Aging* 14, 287–293.

Whitwell, J.L., Przybelski, S.A., Weigand, S.D., Knopman, D.S., Boeve, B.F., Petersen, R.C., and Jack, C.R. (2007). 3D maps from multiple MRI illustrate changing atrophy patterns as subjects progress from mild cognitive impairment to Alzheimer's disease. *Brain J. Neurol.* *130*, 1777–1786.

Wierda, K.D.B., Toonen, R.F.G., de Wit, H., Brussaard, A.B., and Verhage, M. (2007). Interdependence of PKC-Dependent and PKC-Independent Pathways for Presynaptic Plasticity. *Neuron* *54*, 275–290.

Wigge, P., and McMahon, H.T. (1998). The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci.* *21*, 339–344.

Wilhelm, B.G., Mandad, S., Truckenbrodt, S., Kröhnert, K., Schäfer, C., Rammner, B., Koo, S.J., Claßen, G.A., Krauss, M., Haucke, V., et al. (2014). Composition of isolated synaptic boutons reveals the amounts of vesicle trafficking proteins. *Science* *344*, 1023–1028.

Wilson, P.W., Myers, R.H., Larson, M.G., Ordovas, J.M., Wolf, P.A., and Schaefer, E.J. (1994). Apolipoprotein E alleles, dyslipidemia, and coronary heart disease. The Framingham Offspring Study. *JAMA* *272*, 1666–1671.

Wu, L., Rosa-Neto, P., Hsiung, G.-Y.R., Sadovnick, A.D., Masellis, M., Black, S.E., Jia, J., and Gauthier, S. (2012). Early-onset familial Alzheimer's disease (EOFAD). *Can. J. Neurol. Sci. J. Can. Sci. Neurol.* *39*, 436–445.

Xie, Z., Srivastava, D.P., Photowala, H., Kai, L., Cahill, M.E., Woolfrey, K.M., Shum, C.Y., Surmeier, D.J., and Penzes, P. (2007). Kalirin-7 controls activity-dependent structural and functional plasticity of dendritic spines. *Neuron* *56*, 640–656.

Xu, Q., Bernardo, A., Walker, D., Kanegawa, T., Mahley, R.W., and Huang, Y. (2006). Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 4985–4994.

Yamauchi, K., Tozuka, M., Hidaka, H., Nakabayashi, T., Sugano, M., Kondo, Y., Nakagawara, A., and Katsuyama, T. (2000). Effect of apolipoprotein AII on the interaction of apolipoprotein E with beta-amyloid: some apo(E-AII) complexes inhibit the internalization of beta-amyloid in cultures of neuroblastoma cells. *J. Neurosci. Res.* *62*, 608–614.

Yang, D.S., Smith, J.D., Zhou, Z., Gandy, S.E., and Martins, R.N. (1997). Characterization of the binding of amyloid-beta peptide to cell culture-derived native apolipoprotein E2, E3, and E4 isoforms and to isoforms from human plasma. *J. Neurochem.* *68*, 721–725.

Yang, S.N., Tang, Y.G., and Zucker, R.S. (1999). Selective induction of LTP and LTD by postsynaptic $[Ca^{2+}]_i$ elevation. *J. Neurophysiol.* *81*, 781–787.

Yankner, B.A., Caceres, A., and Duffy, L.K. (1990). Nerve growth factor potentiates the neurotoxicity of beta amyloid. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *87*, 9020–9023.

Yassa, M.A., and Stark, C.E.L. (2011). Pattern separation in the hippocampus. *Trends Neurosci.* *34*, 515–525.

Yassa, M.A., Mattfeld, A.T., Stark, S.M., and Stark, C.E.L. (2011). Age-related memory deficits linked to circuit-specific disruptions in the hippocampus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 8873–8878.

Yoshikai, S., Sasaki, H., Doh-ura, K., Furuya, H., and Sakaki, Y. (1990). Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene. *Gene* 87, 257–263.

Young, B.J., Otto, T., Fox, G.D., and Eichenbaum, H. (1997). Memory representation within the parahippocampal region. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 17, 5183–5195.

Zempel, H., Thies, E., Mandelkow, E., and Mandelkow, E.-M. (2010). Abeta oligomers cause localized Ca(2+) elevation, missorting of endogenous Tau into dendrites, Tau phosphorylation, and destruction of microtubules and spines. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 30, 11938–11950.

Zhang, X., Yu, J.-T., Li, J., Wang, C., Tan, L., Liu, B., and Jiang, T. (2015). Bridging Integrator 1 (BIN1) Genotype Effects on Working Memory, Hippocampal Volume and Functional Connectivity in Young Healthy Individuals. *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.*

Zhang, Z., Wang, D., Sun, T., Xu, J., Chiang, H.-C., Shin, W., and Wu, L.-G. (2013). The SNARE proteins SNAP25 and synaptobrevin are involved in endocytosis at hippocampal synapses. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 33, 9169–9175.

Zhou, P., Pang, Z.P., Yang, X., Zhang, Y., Rosenmund, C., Bacaj, T., and Südhof, T.C. (2013). Syntaxin-1 N-peptide and Habc-domain perform distinct essential functions in synaptic vesicle fusion. *EMBO J.* 32, 159–171.