



Dysfonctionnements de la voie endo-lysosomale : de la trisomie 21 à la maladie d'Alzheimer

Alexandra Botté

► To cite this version:

Alexandra Botté. Dysfonctionnements de la voie endo-lysosomale : de la trisomie 21 à la maladie d'Alzheimer. Neurobiologie. Sorbonne Université, 2019. Français. NNT : 2019SORUS038 . tel-02983268

HAL Id: tel-02983268

<https://theses.hal.science/tel-02983268>

Submitted on 29 Oct 2020

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.

Thèse de doctorat
Spécialité biologie cellulaire

**DYSFONCTIONNEMENTS DE LA
VOIE ENDO-LYSOSOMALE :
DE LA TRISOMIE 21 A LA MALADIE D'ALZHEIMER**

Par Alexandra Botté

Dirigée par le Dr. Marie-Claude Potier

Présentée et soutenue publiquement le 18 juin 2019

Jury

Pr. Pierre Aucouturier
Dr. Lydia Danglot
Dr. David Perrais
Dr. Graça Raposo
Dr. Christophe Leterrier
Dr. Marie-Claude Potier

Président
Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Examineur
Directrice de thèse

Remerciements

Je remercie le Pr. Pierre Aucouturier d'avoir accepté de présider mon jury de thèse.

Je remercie le Dr. Lydia Danglot et le Dr. David Perrais d'avoir accepté d'évaluer et de juger ce travail en qualité de rapporteurs.

Je remercie également le Dr. Graça Raposo et le Dr. Christophe Leterrier de participer à mon jury de thèse en tant qu'examineurs.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr. Marie-Claude Potier, ma directrice de thèse. Merci de m'avoir fait confiance pour entreprendre ce projet. J'ai tout particulièrement apprécié de pouvoir travailler et explorer mes hypothèses librement grâce au crédit que tu m'as accordé. Ton encadrement bienveillant et ton optimisme m'ont permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions, et de rester sereine et déterminée dans les moments d'incertitude. Merci de m'avoir donné la chance de présenter mes travaux dans de nombreux congrès internationaux. Je te suis profondément reconnaissante pour tout ce que tu m'as apporté scientifiquement et humainement.

Je remercie la Fondation Vaincre Alzheimer, et notamment le Dr. Maï Panchal, d'avoir financé ma thèse. Je remercie également la Fondation Jérôme Lejeune de m'avoir attribué un Prix Jeune Chercheur en 2018, qui m'a permis de prolonger mon travail de thèse.

Je souhaite remercier le Pr. Charles Duyckaerts, le Dr. Benoît Delatour, le Dr. Serge Marty, le Dr. Jeanne Lainé et le Dr. Jean-Maurice Delabar pour leurs conseils bienveillants et l'expertise qu'ils ont apportés au cours de ma thèse. Je remercie particulièrement Jeanne de m'avoir initiée à la microscopie électronique et d'avoir réalisé ces expériences tout au long du projet, ainsi que pour nos discussions enrichissantes.

Je remercie le Dr. Dean Nizetic et le Dr. Pollyanna Goh de nous avoir fourni des neurones dérivés d'iPSC. Je remercie le Pr. Peter De Deyn et le Dr. Debby Van Dam de nous avoir procuré des échantillons de cerveaux humains. Je remercie l'Institut Jérôme Lejeune d'avoir

constitué et mis à notre disposition une collection de fibroblastes. Je remercie le Dr. Guillaume Van Niel et le Dr. Etienne Morel pour les échanges de matériels et les échanges scientifiques fructueux que nous avons eus tout au long de ma thèse. Je remercie le Dr. Xavier Heiligenstein et le Dr. Graça Raposo de nous avoir permis de réaliser de la microscopie électronique après congélation à haute-pression, ainsi que pour leur expertise. Je remercie le Dr. Boris Keren et son équipe pour le caryotypage des fibroblastes. Enfin, je remercie le Dr. Guillaume Dorothée d'avoir été mon tuteur universitaire.

Je remercie la plateforme ICM.Quant et les anciens de PICPS de m'avoir formée à la microscopie confocale et pour leurs conseils techniques. Un grand merci à la plateforme ImagoSeine de l'Institut Jacques Monod, et notamment à Orestis pour sa patience et sa bonne humeur durant nos séances de microscopie SR-SIM. Je remercie la plateforme Neurimag de l'Institut de Psychiatrie et Neurosciences de Paris, Lydia, Philippe et David, pour leur grande expertise et leurs conseils. Merci à la plateforme d'histologie de l'ICM pour leur accueil toujours très agréable et merci notamment à Annick et Brigitte pour leurs conseils et leur gentillesse. Merci à la plateforme de culture cellulaire CELIS de l'ICM. Merci à la plateforme de cytométrie en flux Cyto-ICAN et à Florence pour son aide précieuse.

Je tiens à remercier toute l'équipe Maladie d'Alzheimer de l'ICM : Ammara, Yah-Sé, Laura, Marta, Amal, Florence, Susana, Geoffrey ainsi que les anciens, Agathe, Luce, Jonathan, Lydie, Fabian, Linda, Kunie, Teng-Fei et Ihsen. Je remercie également les stagiaires que j'ai eu la chance d'encadrer et qui ont contribué à la réalisation de mon projet : Gustavo (Master Erasmus) et Leila (Master ENS).

Je remercie infiniment le bureau « 5.041 ». J'y ai trouvé des collègues extraordinaires, qui sont maintenant des amis chers. Merci à Gaëlle pour ton soutien sans faille, tu m'as appris tant de choses que je ne saurais par où commencer. Ton aide en fin de thèse m'a permis de terminer le projet dans les meilleures conditions, je t'en suis très reconnaissante. C'était une chance et toujours un plaisir de manipuler avec toi. Merci à Christelle pour ton énergie et ton humour qui ont su embellir chaque jour passé au labo. Merci à Alexandre pour ton soutien dans toutes les étapes de la thèse, ton expérience m'a aidée à avancer plus paisiblement. Merci à Manon pour ta gentillesse et ton altruisme qui illuminent notre bureau à chacun de tes passages. Merci à

Arthur, dont la contribution fut courte mais intense. Ces années passées à vos côtés ont été formidables et j'en garderai un souvenir précieux.

Je remercie le Dr. Stéphane Haïk et l'équipe Maladies à Prions, j'ai beaucoup apprécié vous côtoyer pendant toutes ces années. Un merci spécial à Sofian et Alexianne pour votre sympathie et les bons moments passés ensemble.

Merci enfin à toutes les personnes croisées au quotidien au 5^{ème} étage et dans le reste de l'ICM, notamment Nicole, Rolando, Eric, Anh, Violetta, Cyrille, Nadège, Lucas, Lamia, Corinne, Elisa, Elise, Aude, Benjamin, Julie, Javier... Vous avez contribué à égayer mon quotidien !

Je tiens à remercier le Dr. Virginie Buggia-Prévot pour m'avoir fait découvrir le monde de la recherche et m'avoir transmis ta passion et ton optimisme. Ton soutien a beaucoup compté pour moi.

Enfin, je ne remercierai jamais assez mes proches. Merci à mes parents, à Baptiste et à Oscar pour votre soutien inconditionnel et votre écoute. Vos encouragements et vos conseils avisés m'ont toujours permis de progresser et de prendre du recul lorsque j'en avais le plus besoin. J'avance sereinement vers les défis à venir en sachant que je pourrai toujours compter sur vous.

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS	1
RESUME	3
ABSTRACT	5
INTRODUCTION.....	7
1. VOIE ENDO-LYSOSOMALE	9
1.1 Définition de l'endocytose.....	9
1.2 Endocytose et endosome précoce.....	11
1.2.1 Endocytose clathrine-dépendante.....	11
1.2.2 Morphologie, identité moléculaire et fonctionnement des endosomes précoces.....	15
1.2.2.1 Ultrastructure.....	15
1.2.2.2 Identité moléculaire et fonctionnement.....	17
1.2.2.3 Diversité des endosomes précoces : exemple des endosomes de signalisation.....	21
1.3 Voies de sortie de l'endosome précoce	23
1.3.1 Maturation vers la voie de dégradation	23
1.3.2 Recyclage	26
1.3.3 Transport rétrograde	27
1.4 Interactions avec le cytosquelette.....	29
2. MALADIE D'ALZHEIMER ET TRISOMIE 21	31
2.1 Maladie d'Alzheimer	31
2.1.1 Généralités	31
2.1.2 Lésions neuropathologiques.....	32
2.1.2.1 Pathologie amyloïde.....	32
2.1.2.2 Pathologie tau	33
2.1.3 Etiologie.....	34
2.1.3.1 Formes sporadiques et familiales.....	34
2.1.3.2 Facteurs de risque.....	36
2.2 Trisomie 21.....	38
2.2.1 Epidémiologie	38
2.2.2 Modèles murins de la trisomie 21	40
2.2.3 La maladie d'Alzheimer dans la trisomie 21	42
2.3 Métabolisme et trafic de l'APP.....	43
2.3.1 Clivages, produits de clivage et peptide amyloïdes	43
2.3.2 Trafic intracellulaire.....	45
2.3.3 Rôle causal de l'APP dans la maladie d'Alzheimer et hypothèse de la cascade amyloïde	47
3. DYSFONCTIONNEMENTS DU SYSTEME ENDO-LYSOSOMAL DANS LA MALADIE D'ALZHEIMER ET LA TRISOMIE 21.....	51
3.1 Description des phénotypes	51
3.1.1 Endosomes précoces	51
3.1.2 Endosomes tardifs & lysosomes	54
3.1.3 Rétromère	56
3.1.4 Défaut du système endo-lysosomal : conséquences sur le trafic neuronal.....	57
3.2 Gènes et mécanismes impliqués dans les dysfonctionnements endosomaux dans la trisomie 21	58
3.2.1 APP	58
3.2.2 Intersectine-1 (ITSN1).....	60
3.2.3 Synaptojanine-1 (SYNJ1).....	61
3.2.4 Phosphoinositides.....	64
4. HYPOTHESES DE TRAVAIL ET OBJECTIFS	67
MATERIEL ET METHODES	69
RESULTATS.....	85
1. ETUDE DE LA MORPHOLOGIE DES ENDOSOMES PRECOCES EN HAUTE RESOLUTION DANS LA TRISOMIE 21	87
1.1 Microscopie électronique dans des lignées de cellules lymphoblastoïdes (LCL).....	87
1.2 Microscopie confocale et électronique dans des fibroblastes.....	89

1.2.1	Microscopie confocale et microscopie électronique avec marquage avant inclusion.....	89
1.2.2	Microscopie électronique après congélation à haute pression	92
1.3	<i>Microscopie confocale et électronique dans des BFCN de souris Ts65Dn</i>	<i>94</i>
1.4	<i>Microscopie confocale et super-résolution SIM (SR-SIM) dans des neurones humains isogéniques dérivés d'iPSC.....</i>	<i>97</i>
1.4.1	Microscopie confocale.....	97
1.4.2	Microscopie SR-SIM	98
1.5	<i>Microscopie SR-SIM dans le cortex préfrontal d'un individu porteur de T21</i>	<i>101</i>
1.6	<i>Conclusion</i>	<i>102</i>
2.	ETUDE DYNAMIQUE DE LA VOIE ENDOSOMALE DANS LA TRISOMIE 21	103
2.1	<i>Dynamique d'internalisation de la transferrine</i>	<i>103</i>
2.2	<i>Recyclage du récepteur à la transferrine</i>	<i>106</i>
2.3	<i>Dégradation du récepteur à l'EGF.....</i>	<i>107</i>
2.4	<i>Conclusion</i>	<i>110</i>
3.	ANOMALIES MOLECULAIRES DES ENDOSOMES PRECOCES DANS LA TRISOMIE 21.....	111
3.1	<i>Niveaux de membres régulateurs des endosomes précoces.....</i>	<i>112</i>
3.1.1	Niveaux de Rab5 et EEA1	112
3.1.2	Niveau de PI(3)P	114
3.2	<i>Etude de l'effet d'un inhibiteur de PIKfyve dans des fibroblastes T21</i>	<i>118</i>
3.2.1	Niveau d'EEA1 après traitement des fibroblastes à l'inhibiteur de PIKfyve	118
3.2.2	Production d'Aβ après traitement des fibroblastes à l'inhibiteur de PIKfyve.....	121
3.2.3	Effet de l'inhibition de PIKfyve sur la morphologie des endosomes précoces	122
3.3	<i>Conclusion</i>	<i>123</i>
	DISCUSSION	125
1.	DISCUSSION DE LA PARTIE 1 DES RESULTATS : CARACTERISATION MORPHOLOGIQUE DES ENDOSOMES PRECOCES DANS LA TRISOMIE 21	127
2.	DISCUSSION DE LA PARTIE 2 DES RESULTATS : DYNAMIQUE DE LA VOIE ENDOSOMALE DANS LA TRISOMIE 21	132
3.	DISCUSSION DE LA PARTIE 3 DES RESULTATS : ETUDE MOLECULAIRE DE LA VOIE ENDOSOMALE DANS LA TRISOMIE 21	135
4.	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	141
	REFERENCES.....	145
	ANNEXES	175
	ANNEXE 1.....	177
	ANNEXE 2.....	221

Liste des abréviations

APOE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloid Precursor Protein
APPL	Adaptor Protein, Phosphotyrosine interacting with PH domain and Leucine zipper
A β	Amyloid β
ATP	Adénosine Triphosphate
BACE1	Beta-site APP-Cleaving Enzyme 1
BFCN	Basal Forebrain Cholinergic Neurons
BSA	Bovine Serum Albumine
CTF	C-Terminal Fragment
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EGF	Epidermal Growth Factor
EP	Endosomes Précoces
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FYVE	Fab1/YOTB/Vac1/EEA1
GAP	GTPase Activating Proteins
GDI	GDP Dissociation Inhibitor
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF	Guanine nucleotide Exchange Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GTP	Guanosine Triphosphate
GWAS	Genome Wide Association Study
HRP	Horseradish Peroxidase
HSA	Chromosome humain
iPSC	induced Pluripotent Stem Cells
LCL	Lignée de Cellules Lymphoblastoïdes
MMU	Chromosome de souris
MSN	Medial Septum Nucleus

MVB	Multivesicular Body
PI	Phosphatidylinositol
PI(3)P	Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PI(3,5)P ₂	Phosphatidylinositol-3,5-Phosphate
PI(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-Phosphate
PICALM	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PSEN	Préséniline
SNX	Sorting Nexin
T21	Trisomie 21
TGN	Trans-Golgi Network
WT	Wild-Type
2N	Euploïde

Résumé

L'élargissement des endosomes précoces (EP) a été amplement décrit dans la trisomie 21 (T21) et la maladie d'Alzheimer (MA). La présence d'EP élargis a été démontrée dans des neurones avant même le développement de la neuropathologie et des symptômes de la MA. L'élargissement des EP a également été identifié dans des cellules périphériques d'individus porteurs de T21 et de patients atteints de MA, ainsi que dans les neurones de souris modèles de MA et de T21. Il a été proposé que la surexpression d'APP induise l'augmentation de Rab5 activé, causant ainsi l'élargissement des EP. Cependant, certaines observations suggèrent une origine multifactorielle à l'élargissement des EP. Malgré la taille des EP (de l'ordre de la centaine de nanomètres), leur morphologie n'a jamais été analysée à haute résolution. Dans cette étude, nous caractérisons les EP et la voie endosomale dans la T21 afin de mieux en comprendre les phénotypes et les mécanismes moléculaires associés.

Grâce à différentes méthodes de microscopie électronique et à l'imagerie à illumination structurée super-résolutive (SR-SIM), nous observons dans de nombreux modèles de T21 une augmentation du nombre d'EP de taille normale ayant tendance à s'agréger plutôt que des EP élargis. Nous montrons que le recyclage du récepteur à la transferrine est augmenté alors que la dégradation du récepteur à l'EGF est ralentie. Nous montrons ensuite que les niveaux de Rab5 et de PI(3)P sont augmentés, alors que le niveau d'EEA1 est diminué. Enfin, l'inhibition de PIKfyve, une kinase impliquée dans le métabolisme des phosphoinositides, permet de rétablir le niveau d'EEA1 et la production d'A β dans des fibroblastes d'individus porteurs de T21.

Notre étude redéfinit les phénotypes de la voie endo-lysosomale dans la T21 aux niveaux morphologiques, dynamiques et moléculaires. Ces résultats apportent de nouvelles hypothèses mécanistiques pour expliquer les anomalies endosomales dans la T21 et la MA, et participent à la compréhension du rôle du système endo-lysosomal dans ces deux pathologies.

Abstract

Abnormal early endosome (EE) enlargement was widely characterized in the brain of individuals with Down syndrome (DS) and Alzheimer's disease (AD) patients. Neurons bearing enlarged EE have been described before the development of the neuropathological hallmarks and clinical symptoms of AD. EE enlargement was also detected in peripheral cells from individuals with DS and AD patients and in the brain of mouse models of familial AD and DS. It was proposed that APP overexpression would abnormally activate Rab5, leading to EE enlargement. However, several lines of evidence rather suggest multifactorial causes to EE enlargement. Despite the nanometric size range of EE, this phenotype was never quantified with high resolution microscopy. Here, we characterize EE and the endo-lysosomal pathway in DS in order to better understand endosomal phenotypes and their underlying molecular mechanisms.

With electron microscopy technics and super-resolution structured illumination microscopy, we observe an increased number of normal-sized EE with a tendency to clustering rather than enlarged EE in various DS models. We show that the transferrin receptor recycling is accelerated, while the degradation of the EGF receptor is delayed. Then, we show that the levels of Rab5 and PI(3)P are decreased but the level of EEA1 is increased. Finally, the inhibition of PIKfyve, a kinase implicated in phosphoinositides metabolism, rescues the level of EEA1 and A β production in fibroblastes from individuals with DS.

Our study redefines phenotypes of the endo-lysosomal pathway in DS, at morphological, dynamic and molecular levels. These results provide new hypotheses to explain endosomal abnormalities in DS and AD, and bring insights into the comprehension of the role the endo-lysosomal pathway in both pathologies.

INTRODUCTION

1. Voie endo-lysosomale

1.1 Définition de l'endocytose

L'endocytose désigne un des mécanismes d'entrée de molécules dans la cellule eucaryote. Il s'agit d'un processus destiné à internaliser et transporter des macromolécules situées à la membrane plasmique et dans le milieu extracellulaire vers l'intérieur de la cellule. Elle consiste en un mouvement d'invagination puis de scission de la membrane plasmique afin de créer une vésicule intracellulaire. Les vésicules d'endocytose fusionnent ensuite avec les endosomes précoces. L'endocytose est indispensable au fonctionnement de la cellule. Elle assure, entre autres, un apport en nutriments, permet d'activer des voies de signalisation, régule la tension membranaire en équilibre dynamique avec l'exocytose, et a un rôle majeur dans la neurotransmission.

Il existe deux grands modes d'endocytoses : la phagocytose et la pinocytose. La phagocytose est essentiellement restreinte à certaines cellules spécialisées appelées phagocytes, et permet l'internalisation de particules de grande taille (supérieures à $0,5\ \mu\text{m}$) voire de cellules entières. Elle est indispensable à la réaction immunitaire car elle permet l'élimination de microorganismes pathogènes ou de particules exogènes. Le second type d'endocytose, la pinocytose, permet l'internalisation de solutés présents dans le milieu extracellulaire ou de macromolécules membranaires, de manière spécifique ou non. Elle est divisée en plusieurs sous-catégories majeures :

- **Macropinocytose** : elle est basée sur un réarrangement de filaments d'actine dû à l'activation de récepteurs tyrosine-kinase. La protrusion de la membrane plasmique due à l'actine se referme pour former un macropinosome. C'est un processus non-sélectif qui internalise un grand volume de milieu extracellulaire.
- **Endocytose clathrine-dépendante** : découverte dans les années 1970 (Anderson et al., 1976) dans des fibroblastes, ce type d'endocytose est caractérisé par la présence d'un manteau de clathrine au niveau de puits membranaires et des vésicules

d'endocytoses qui en émergent. Elle permet l'endocytose sélective de récepteurs et leurs ligands. Les molécules internalisées puis transportées dans la voie endosomale sont appelées « cargo ». Les mécanismes en sont détaillés dans la section suivante.

- **Endocytose par les cavéoles** : elle est initiée par la présence d'oligomères de cavéolines ancrés au niveau de microdomaines de la membrane plasmique enrichis en cholestérol et sphingolipides (similaires à des radeaux lipidiques). Comme dans l'endocytose clathrine-dépendante, elle requiert la dynamine lors du détachement entre vésicule et membrane plasmique. Les cavéoles sont des vésicules de petite taille (60 – 80 nm de diamètre).
- **Endocytose clathrine- et cavéoline-indépendante** : dépendante ou non de la dynamine, elle a également lieu au niveau de microdomaines lipidiques de la membrane plasmique.

Les vésicules formées par les différentes voies de l'endocytose fusionnent avec les endosomes précoces, carrefour et plateforme de tri au cœur de plusieurs voies possibles. Les complexes SNAREs (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) forment la machinerie de fusion membranaire entre de nombreux compartiments, dont les vésicules d'endocytose et les endosomes. Les mécanismes précis de la fusion entre les bicouches lipidiques ne seront pas détaillés.

Parmi les différents types d'endocytose, l'endocytose clathrine-dépendante semble être la voie majeure d'internalisation des récepteurs (Bitsikas et al., 2014). De plus, l'Amyloid Precursor Protein (APP) dont nous parlerons plus loin, est principalement endocyté par cette voie (Nordstedt et al., 1993, Yamazaki et al., 1996, Perez et al., 1999, Prabhu et al., 2012). C'est pourquoi les sections suivantes décrivent plus en détails les mécanismes spécifiques à l'endocytose clathrine-dépendante.

1.2 Endocytose et endosome précoce

1.2.1 Endocytose clathrine-dépendante

L'endocytose dépendante de la clathrine a été initialement observée en microscopie électronique par Roth & Porter en 1964 (Roth and Porter, 1964), dans une étude de l'internalisation de protéines dans l'ovocyte de moustique. Une série de travaux d'Anderson, Brown et Goldstein sur l'internalisation des LDL (Low Density Lipoproteins) (Brown and Goldstein, 1976, Anderson et al., 1977, Goldstein et al., 1979), ainsi que la purification de la clathrine (Pearse, 1975) et l'identification de la structure des cages de clathrine par microscopie électronique (Crowther et al., 1976), ont ensuite permis d'élaborer le modèle de base de l'internalisation de récepteurs clathrine-dépendante (Goldstein et al., 1979).

La molécule de clathrine forme une unité fonctionnelle appelée « triskèle ». Un triskèle est constitué de trois chaînes lourdes (190 kDa) associées à trois chaînes légères (25 kDa) (Ungewickell and Branton, 1981, Kirchhausen and Harrison, 1981). Le cœur ou « *hub* » du triskèle (situé en C-terminal des chaînes lourdes) permet la polymérisation, et la région périphérique (située en N-terminal des chaînes lourdes) interagit avec des complexes adaptateurs via la séquence « boîte clathrine ». Les triskèles s'assemblent entre eux en hexagones et pentagones, et la courbure de l'assemblage permet de former la cage de clathrine autour de la vésicule d'endocytose en cours de formation (figure 1).

La première étape de l'endocytose clathrine-dépendante a pour but de recruter des protéines à internaliser par des protéines adaptatrices intracellulaires. Pour ce faire, les protéines transmembranaires interagissent avec des membres de la machinerie intracellulaire de l'endocytose associés à la clathrine. Ainsi, la membrane plasmique s'enrichit localement en récepteurs à internaliser, où les vésicules d'endocytose se formeront. Le premier acteur ayant été identifié lors de cette étape est le complexe AP2 (Adaptor Protein complex 2). Le complexe AP2 est un hétérotétramère composé de deux sous-unités lourdes (appelées α - et β -adaptines) et de deux sous-unités légères (appelées μ et σ). Le complexe AP2 dispose de sites de liaisons à la fois pour les cargos (motifs de signaux tyrosine, séquences di-leucines) et pour la clathrine (séquence « boîte clathrine ») (Davis et al., 1986, Letourneur and Klausner, 1992). AP2 est en conformation fermée quand il est cytoplasmique, rendant inaccessibles les sites de liaisons. Il

est recruté à la membrane plasmique par liaison avec le PI(4,5)P₂ et passe alors en conformation ouverte, permettant la liaison avec les récepteurs transmembranaires et la clathrine (Gaidarov and Keen, 1999, Kelly et al., 2014). La liaison d'AP2 avec un cargo le stabilise en conformation ouverte à la membrane et lui permet de recruter la clathrine. Cette triple interaction coordonne l'association entre les cargos et la clathrine localisée à la membrane plasmique. La liaison de triskèles de clathrine à AP2 le stabilise à la membrane, renforçant le recrutement de ces deux complexes (Cocucci et al., 2012). Le manteau de clathrine peut ainsi se former et croître autour de la vésicule.

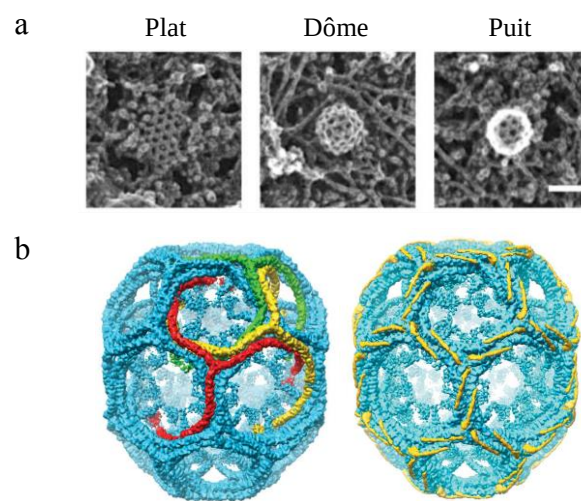


Figure 1. Structure de la cage de clathrine

a. Cage de clathrine observée en microscopie électronique (technique du « unroofing »), ayant une structure plate, en dôme, ou en puit. Barre d'échelle = 100 nm. D'après (Bucher et al., 2018)
b. Modélisations d'une cage de clathrine montrant les chaînes lourdes de trois triskèles indépendants en rouge, jaune et vert (gauche) et les chaînes légères en jaune (droite). D'après (Fotin et al., 2004).

La machinerie d'initiation de l'endocytose clathrine-dépendante comporte de nombreuses protéines accessoires qui interagissent (figure 2). Les complexes FCHO1/2 (F-BAR domain only protein 1) sont recrutés à la membrane plasmique, dont ils peuvent détecter et modifier la courbure (Henne et al., 2007). Ils recrutent également AP2. Les protéines PICALM (Phosphatidylinositol clathrin binding assembly protein, un facteur de risque pour la maladie d'Alzheimer détaillé en section 2.1.3.2) et EPS15 (EPidermal growth factor receptor Substrate 15) peuvent également influencer la courbure de membrane plasmique et servir d'adapteurs pour des cargos aux signaux spécifiques (Ford et al., 2002, Miller et al., 2015).

L'invagination de la membrane plasmique nécessaire à la formation de la vésicule recouverte de clathrine a deux origines : la clathrine elle-même et le cytosquelette d'actine. Le mécanisme par lequel la clathrine participe à la courbure de la membrane n'est pas consensuel, deux modèles ont été formulés. Le premier modèle propose que la clathrine forme un réseau moléculaire initialement plat, qui s'incurve sans changer de surface en remodelant les hexagones en pentagones. Dans le second modèle, le réseau de clathrine s'agrandit autour d'une vésicule selon une courbure constante (Kaksonen and Roux, 2018).

Le cytosquelette d'actine contribue à l'invagination de la membrane plasmique en se polymérisant transitoirement autour du manteau de clathrine. Ce mécanisme a été moins étudié chez les mammifères que chez la levure. Néanmoins, il semblerait que la polymérisation locale d'actine autour de la vésicule (association clathrine-actine via adaptateurs) vers la membrane plasmique repousse la vésicule vers l'intérieur de la cellule pour former le cou de la vésicule (Collins et al., 2011). Chez les mammifères, l'actine interviendrait assez tard dans la formation de la vésicule, alors que la tension de la membrane (liée à la courbure) est déjà importante (Boulant et al., 2011).

Une fois que la vésicule en cours de formation est suffisamment invaginée, elle doit être séparée de la membrane plasmique. Cette étape est dépendante de la dynamine, qui est recrutée par les protéines portant un domaine BAR (Bin/Amphiphysin/Rvs) et une hélice amphipathique en N-terminal (N-BAR, par exemple amphiphysin, endophilin) (Daumke et al., 2014). La dynamine lie également le PI(4,5)P₂ membranaire (Jost et al., 1998). La dynamine est une GTPase capable de se polymériser sous la forme d'une hélice autour du cou du puit de clathrine invaginé. Cette hélice se contracte grâce à l'hydrolyse de la GTP (Guanosine TriPhosphate), jusqu'à la scission entre la membrane plasmique et la membrane limitante de la vésicule d'endocytose couverte de clathrine.

Afin de pouvoir fusionner avec sa cible, notamment l'endosome précoce, la vésicule d'endocytose doit se défaire de son manteau protéique. Il s'agit de l'étape d'« *uncoating* ». Suite à la liaison de l'auxilin à la clathrine et à la dynamine, Hsc70 est recruté à la vésicule coatée (Ungewickell et al., 1995). L'Hsc70 est lié à l'ATP (Adénosine Triphosphate) lors de son recrutement, et l'hydrolyse en ADP (Adénosine Diphosphate) permet la libération des triskèles de clathrine (Braell et al., 1984, Schlossman et al., 1984, Ungewickell, 1985). Le modèle mécanistique précis reste encore débattu (Sousa and Lafer, 2015).

Enfin, le changement de composition en phosphoinositides à la membrane de la vésicule participe au désassemblage de la clathrine. Le PI(4,5)P₂ est présent à la membrane plasmique et à la membrane de la vésicule depuis l'initiation de l'endocytose. Il joue un rôle majeur dans la formation et la maturation des vésicules d'endocytose (Antonescu et al., 2011) et le recrutement des protéines adaptatrices de la clathrine car elles ont un domaine liant directement le PI(4,5)P₂ (Schink et al., 2016). La conversion du PI(4,5)P₂ en PI(4)P par SYNJ1 (synaptojanine 1, codée par un gène du chromosome 21 et impliquée dans les anomalies endosomales dans la trisomie 21, détails en section 3.2.3) est centrale dans l'*uncoating* de la vésicule d'endocytose. Il a été montré que les vésicules couvertes de clathrine s'accumulent anormalement dans la synapse de souris dont le gène codant SYNJ1 est invalidé (Cremona et al., 1999, Mani et al., 2007, Kim et al., 2002). Une fois chargées de molécules à internaliser et défaits de leurs manteaux de clathrine, les vésicules d'endocytose néoformées poursuivent leur route vers l'endosome précoce, plateforme de tri des cargos.

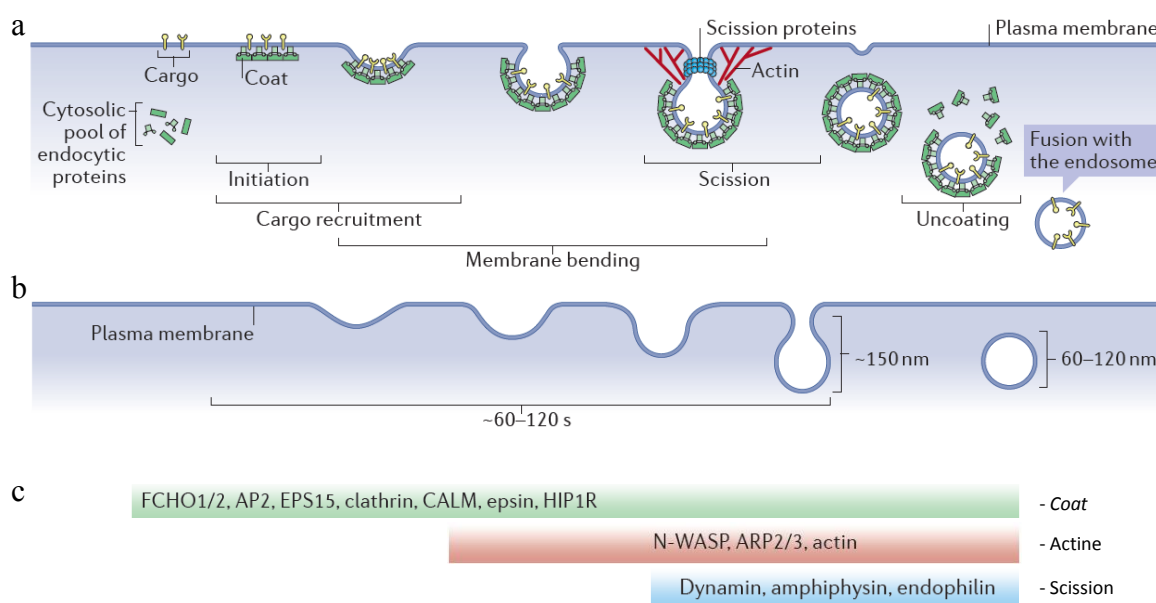


Figure 2. Étapes de d'endocytose clathrine-dépendante

a. Le recrutement d'adaptateurs et le regroupement des cargos permettent d'initier la formation du manteau de clathrine. La membrane s'invagine puis la dynamine et l'actine assurent la scission entre la vésicule et la membrane plasmique. La vésicule perd ensuite son manteau de clathrine (« *uncoating* ») et peut alors fusionner avec l'endosome précoce b. Ces étapes sont très rapides à température physiologique, et aboutissent à la formation d'une vésicule de l'ordre de 100 nm c. De nombreuses protéines participent à la machinerie fonctionnelle de l'endocytose, de manière coopérative. On peut distinguer les membres du *coat*, de la machinerie de l'actine et de la machinerie de scission. D'après (Kaksonen and Roux, 2018).

1.2.2 Morphologie, identité moléculaire et fonctionnement des endosomes précoces

Dans toutes les voies d'internalisation, les vésicules d'endocytose convergent vers une population d'organelles intracellulaires spécialisées dans le tri des molécules cargos : les endosomes précoces. Les molécules dirigées vers les endosomes précoces pourront ensuite retourner à la membrane plasmique par les voies de recyclage, être dégradées dans les lysosomes par la voie de dégradation, ou bien suivre un transport rétrograde notamment vers l'appareil de Golgi, le TGN (Trans-Golgi Network). L'identité protéique et lipidique des endosomes évolue le long de ces voies, et elle aide à distinguer les différentes populations d'endosomes. La classification des endosomes tient compte de leur morphologie, leur fonction et leur identité moléculaire.

La diversité morphologique des endosomes reflète leurs nombreuses fonctions. Le terme d'endosome précoce, également appelé endosome de tri, désigne une population d'organelles très dynamiques, présentant des caractéristiques morphologiques et moléculaires à la fois distinctives et variables selon les stades de maturation et les types cellulaires. Ces aspects sont développés dans les paragraphes suivants. En plus des cargos qui sont adressés aux endosomes précoces par les vésicules d'endocytose, les endosomes précoces reçoivent du matériel du TGN. Les endosomes précoces interagissent entre eux par fusion homotypique et avec les vésicules d'endocytose par fusion hétérotypique. Ces fusions permettent l'échange de cargos des membranes « donneuses » aux membranes « accepteuses ».

1.2.2.1 *Ultrastructure*

Les endosomes précoces sont des organelles dont le diamètre varie généralement de 100 nm à 500 nm, mais pouvant aller jusqu'à quelques microns dans certains types cellulaires comme les fibroblastes. En raison de cette taille à la limite de la résolution des microscopes optiques classiques, la morphologie détaillée des endosomes précoces a été étudiée par microscopie électronique. On distingue les endosomes précoces des vésicules d'endocytose par l'absence d'un manteau de clathrine dense aux électrons entourant la totalité de la vésicule d'endocytose nouvellement formée (figure 3). De plus, les vésicules d'endocytose sont généralement plus petites que les endosomes, avec un diamètre d'environ 100 nm. Un manteau en bicouche

disposé sous forme de plaque peut parfois être observé sur la membrane des endosomes précoces (Klumperman and Raposo, 2014). Les endosomes précoces ont une structure généralement vacuolaire avec quelques tubules en émanant. La lumière des endosomes vacuolaires, transparente aux électrons, contient quelques vésicules intra-luminales (figure 3). Ces vésicules sont issues d'invaginations de la membrane limitante de l'endosome, et leur formation constitue une étape vers la voie de dégradation des cargos vers le lysosome. Au cours de la maturation des endosomes dans la voie de dégradation, les endosomes tardifs, ou corps multivésiculaires (MVB, MultiVesicular Bodies), contiennent un nombre croissant de vésicules intra-luminales (ILV) (processus décrit en section 1.3.1). Les tubules des endosomes précoces sont associés à la voie de recyclage des cargos vers la membrane plasmique ou au transport rétrograde. Au niveau du recyclage, on distingue schématiquement la voie rapide qui permet le recyclage des cargos directement depuis les tubules des endosomes précoces et la voie lente qui émane d'un pool d'endosomes de recyclage tubulaires. Le transport rétrograde des cargos depuis les tubules vers le TGN et le réticulum endoplasmique est médié par le complexe du rétromère (Taguchi, 2013).

Les différents compartiments de la voie endosomale sont distinguables par les marqueurs spécifiques qu'ils portent à leur surface. Par exemple, les endosomes précoces (ou de tri) sont marqués par la Rab-GTPase Rab5 et EEA1 (Early Endosome Antigen 1). Les endosomes de recyclage sont marqués entre autres par Rab4 et Rab11 et les endosomes tardifs par Rab7. Cependant, un chevauchement de ces marqueurs sur une même organelle ou la présence d'un marqueur donné sur des organelles fonctionnellement distinguables peuvent être observé (discuté en section 1.2.2.3). De nombreuses études utilisant des marqueurs internalisés, (HRP, Horse radish peroxidase ou BSA, Bovine serum albumine-gold en phase fluide, ligand marqué, immunomarquage de récepteurs) ont permis d'évaluer la cinétique de l'endocytose par microscopie électronique. Ces marqueurs atteignent les endosomes précoces en 3 minutes à 37°C dans des lymphocytes de type B (Kleijmeer et al., 1997), et cela varie selon le type cellulaire étudié. Les endosomes de recyclage sont atteints après 5 minutes d'internalisation à 37°C (Tooze and Hollinshead, 1991), et les compartiments plus tardifs (endosomes tardifs puis lysosomes) sont atteints après 10 minutes d'internalisation.

La structure des endosomes précoces est reconnaissable avec toutes les techniques de microscopie électronique existantes. Cependant, il est important de noter que la méthode de fixation des échantillons peut modifier la morphologie des endosomes. La fixation chimique utilisant des aldéhydes peut induire une réduction/déformation artéfactuelle des endosomes, alors que la fixation physique par congélation des échantillons rend une morphologie fidèle à la réalité (Murk et al., 2003). Les deux méthodes ont été utilisées au cours de cette thèse, et seront discutées.

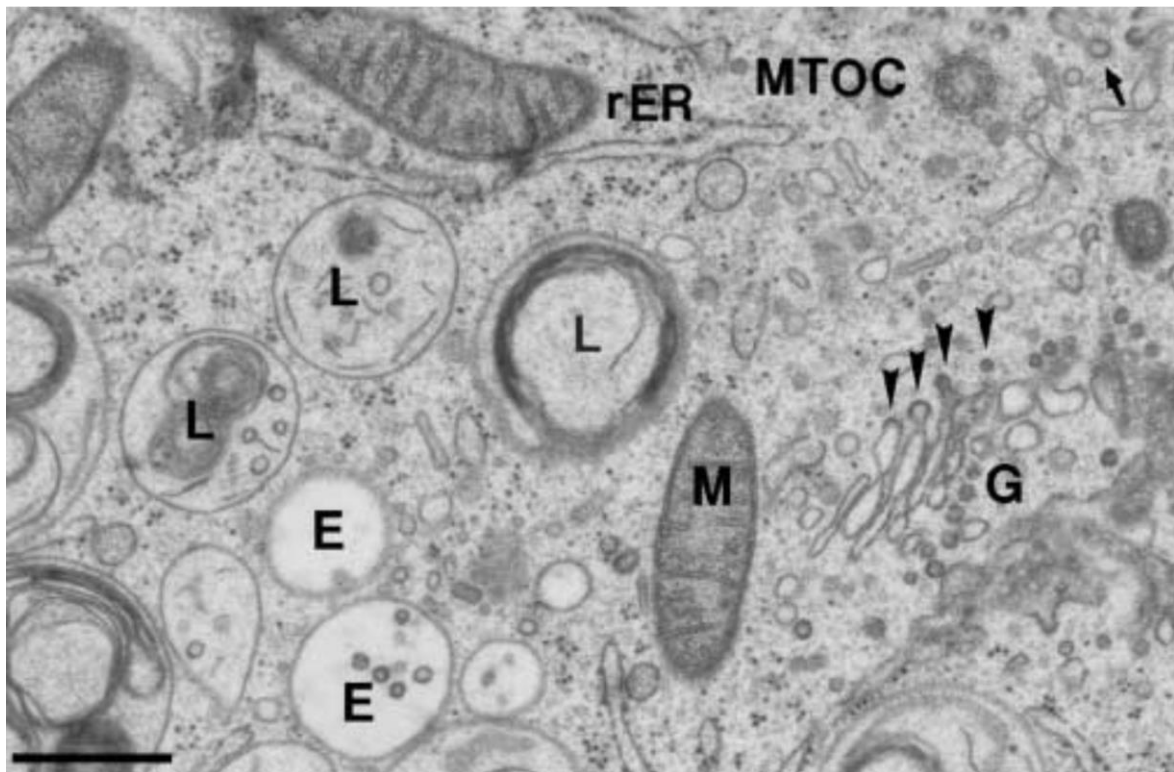


Figure 3. Ultrastructure du système endo-lysosomal

Micrographe d'une cellule RN (lignée de cellules B humaines) fixée par congélation à haute pression. On y observe des endosomes précoces (E) contenant quelques ILV et des lysosomes (L) ayant un contenu d'aspect variable. On peut également observer une mitochondrie (M), l'appareil de Golgi (G), le centre organisateur des microtubules (MTOC) et du réticulum endoplasmique rugueux (rER). Les têtes de flèche indiquent des vésicules ayant un coat de type COP (Coat protein), et la flèche indique une vésicule couverte de clathrine. Barre d'échelle = 500 nm. D'après (Murk et al., 2003).

1.2.2.2 Identité moléculaire et fonctionnement

Comme dans tout trafic intracellulaire, les compartiments du système endo-lysosomal sont régulés par les protéines Rab. La famille des protéines Rab est composée d'environ 70 membres différents. Elles font partie de l'identité moléculaire des organelles intracellulaires, dont elles

régulent le trafic. La distribution sélective des Rab à la membrane des différentes organelles leur confère une identité fonctionnelle et permet la spécificité du trafic vésiculaire. Ce sont des GTPases monomériques qui fonctionnent selon un cycle d'activation / désactivation. Dans leur état inactif, elles sont liées au GDP et cet état est stabilisé par la liaison à une GDI (GDP Dissociation Inhibitors) dans le cytoplasme. L'activation des Rab requiert une GEF (Guanine-nucleotide Exchange Factor) qui stabilise la Rab à la membrane de l'organelle. Les Rab activées interagissent avec des effecteurs qui leur sont spécifiques, et qui jouent des rôles variés et primordiaux pour le trafic vésiculaire (Gillingham et al., 2014).

Rab5. La membrane des endosomes précoces est caractérisée par la présence de Rab5 (bien qu'on le trouve également à la membrane plasmique et à la membrane des vésicules d'endocytose) (Chavrier et al., 1990). Rab5 est le régulateur principal de la fusion homotypique et hétérotypique des endosomes (Bucci et al., 1992) et est indispensable à la biogenèse et au maintien du compartiment endo-lysosomal (Zeigerer et al., 2012). Comme pour toute protéine Rab, l'état inactif de Rab5 est stabilisé par son association avec une Rab-GDI, qui lui permet également d'être soluble dans le cytosol (Ullrich et al., 1993). L'activité GEF de la protéine Rabex-5 associée à la Rabaptine-5 permet d'activer et recruter Rab5 à la membrane endosomale (Stenmark et al., 1995, Horiuchi et al., 1997, Lippe et al., 2001) (figure 4). Une boucle de

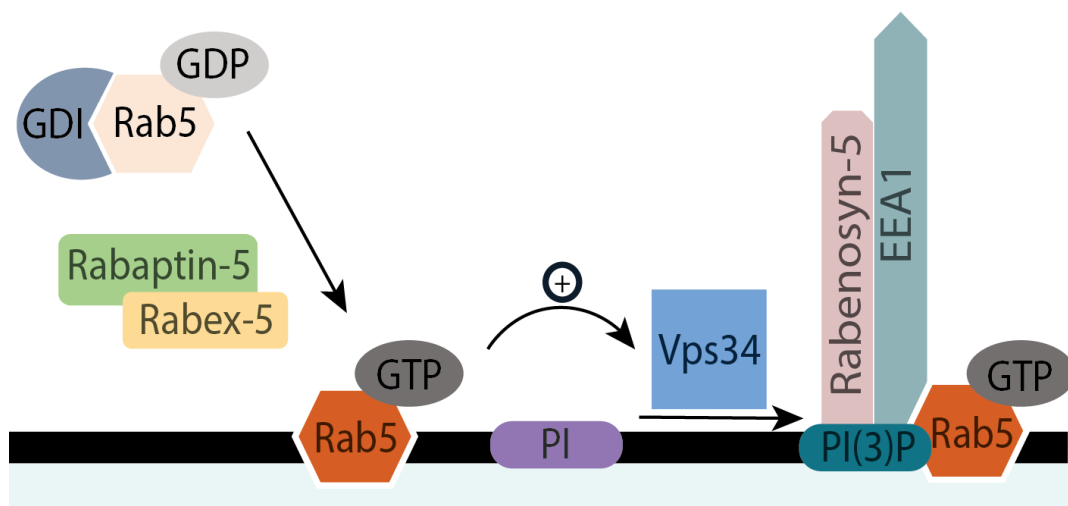


Figure 4. Machinerie moléculaire canonique à la membrane des endosomes précoces
Rab-GDP est stabilisé dans le cytoplasme par une GDI, puis il est recruté à la membrane des endosomes précoces par le complexe Rabaptin-5/Rabex-5 et échange la GDP pour le GTP. Désormais actif, Rab5 active Vps34, qui phosphoryle le PI en PI(3)P. Les effecteurs, comme Rabenosyn-5 et EEA1, peuvent alors s'ancrer à la membrane des endosomes précoces.

rétrocontrôle positive augmente le recrutement du complexe Rabex-5/Rabaptin-5, permettant une augmentation localisée de Rab5-GTP sur la membrane de l'endosome. La compréhension du rôle de Rab5 dans la régulation de la voie endosomale a été permise par l'étude des mutants Rab5-Q79L (constitutivement actif) et Rab5-S64N (constitutivement inactif). L'expression de Rab5-Q79L entraîne l'augmentation de la taille des endosomes précoces par augmentation de la fusion, augmentation de l'internalisation du récepteur à la transferrine et inhibition de son recyclage. A l'inverse, l'expression de Rab5-S64N induit l'accumulation d'endosomes de petite taille (~100 nm de diamètre) en périphérie de la cellule (Stenmark et al., 1994, Wegner et al., 2010, Roberts et al., 1999). L'état de Rab5 régule donc la fusion endosomale, par l'intermédiaire d'effecteurs décrits ci-dessous.

PI 3-K Vps34 / PI(3)P. Rab5-GTP active une phosphoinositide-3-OH kinase, la PI 3-K de classe III Vps34 (Li et al., 1995, Christoforidis et al., 1999). Elle est présente dans la voie endosomale et dans la voie de l'autophagie. Vps34 forme un complexe avec d'autres protéines : p150 (Vps15 chez la levure), Beclin1 (Vps30 chez la levure) et UVRAG (Vps38 chez la levure) dans la voie endosomale ou ATG14 dans la voie de l'autophagie (Kihara et al., 2001, Stack et al., 1993, Itakura et al., 2008). Cette kinase phosphoryle le phosphatidylinositol (PI) en position D-3 du cycle inositol, produisant le phosphatidylinositol-3-phosphate (PI(3)P). A l'endosome précoce, la production locale de PI(3)P est ainsi couplée à la présence de Rab5-GTP au niveau de microdomaines fonctionnels. Outre son action sur Vps34, Rab5 peut favoriser la production de PI(3)P en stimulant des phosphatidylinositol 4- et 5- phosphatases (Shin et al., 2005). A son tour, PI(3)P ancre différents effecteurs à l'endosome précoce, tels que EEA1, Rabenosyn-5, les sorting nexins ou des membranes de la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport), grâce à la liaison avec les domaines FYVE ou PX que portent ces protéines (Stenmark et al., 1996, Gaullier et al., 1998, Patki et al., 1998, Nielsen et al., 2000, Burd and Emr, 1998) (figure 4). Le domaine FYVE a été nommé avec les initiales des premières protéines dans lesquelles il a été identifié (Fab1/YOTB/Vac1/EEA1) (Stenmark et al., 1996). La régulation de la quantité locale de PI(3)P joue un rôle important pour les fonctions remplies par les effecteurs qu'il recrute. Le PI(3)P peut être déphosphorylé en PI par les phosphatases de la famille des myotubularines (MTMR), phosphorylé en position 5 en PI(3,5)P₂ par la kinase PIKfyve ou dégradé lors de la maturation des endosomes vers les lysosomes.

L'approche la plus commune pour localiser et imager le PI(3)P est l'utilisation des domaines d'interactions FYVE et PX comme sondes. La haute spécificité du domaine FYVE de la Hrs pour le PI(3)P en a fait le premier outil pour détecter le PI(3)P *in vivo*. Pour augmenter sa spécificité, la sonde synthétique a été construite avec 2 domaines FYVE (2XFYVE). La sonde 2XFYVE peut être utilisée sous forme plasmidique (couplée à une protéine fluorescente ou à un *tag*) et sous forme protéique (couplée à un *tag*) (Gillooly et al., 2000). Par la suite, le domaine PX de p40phox a également été utilisé sous forme de sonde pour détecter le PI(3)P (Kanai et al., 2001). La limite de l'utilisation de sondes plasmidiques à transfecter réside dans le niveau d'expression de la sonde. Un niveau d'expression trop élevé peut déréguler la voie endosomale en gênant la liaison des effecteurs au PI(3)P. L'utilisation des sondes protéiques après fixation de l'échantillon permet de contourner ce problème. Il existe également un anticorps anti-PI(3)P, dont la spécificité sera discutée.

L'inhibition chimique de la PI 3-K Vps34 par la wortmannin a largement contribué à la compréhension du rôle du PI(3)P à la membrane endosomale, malgré une spécificité discutable de l'inhibiteur (Cross et al., 1995, Nakanishi et al., 1995). L'inhibition par la wortmannin a démontré l'implication du PI(3)P et de ses effecteurs à différents niveaux de l'endocytose : internalisation du récepteur à la transferrine et de la phase fluide (Li et al., 1995, Clague et al., 1995, Spiro et al., 1996), fusion des endosomes (Li et al., 1995, Spiro et al., 1996, Jones and Clague, 1995), recyclage de récepteurs (Li et al., 1995, Spiro et al., 1996, Kurashima et al., 1998, Shpetner et al., 1996, Bright et al., 2001, Hunyady et al., 2002), formation des ILV (Futter et al., 2001) et maturation des endosomes vers la voie de dégradation (Joly et al., 1995, Shpetner et al., 1996, Fernandez-Borja et al., 1999).

Effecteurs. Les effecteurs de Rab5 incluent des protéines d'ancrage et de fusion, protéines régulatrices des Rab et des phosphoinositides, effecteurs de liaison avec des protéines motrices, kinases, phosphatases. Nous n'allons pas en faire un descriptif exhaustif, mais nous donnons l'exemple des protéines d'ancrage. Il existe deux types de facteurs d'ancrage : les protéines à superhélice, *coiled-coil* en anglais (EEA1, rabenosyn-5) (figure 4) et les complexes multi-protéiques (CORVET et HOPS dans les endosomes tardifs) (Gautreau et al., 2014).

EEA1 est un effecteur de Rab5 primordial dans l'amarrage et l'ancrage des vésicules distantes en vue de leur fusion avec l'endosome précoce. EEA1 forme un dimère asymétrique (Callaghan et al., 1999) liant à la fois le PI(3)P via son domaine FYVE situé en C-terminal (Stenmark et

al., 1996) et Rab5-GTP en région C-terminale et N-terminale (Simonsen et al., 1998, Lawe et al., 2000). Cette double interaction Rab5/PI(3)P en C-terminal permet de localiser EEA1 spécifiquement à la membrane de l'endosome précoce, et non sur d'autres membranes PI(3)P-positives (nombreuses dans l'autophagie par exemple) et Rab5-positives (membrane plasmique et vésicules d'endocytose) (Rubino et al., 2000, Wilson et al., 2000). La capacité d'EEA1 à lier Rab5 à chaque extrémité et PI(3)P en C-terminal lui permet d'initier une fusion hétérotypique (avec une vésicule d'endocytose) ou homotypique (avec un autre endosome précoce) entre la vésicule distante Rab5-positive et l'endosome précoce sur lequel il est ancré en C-terminal. EEA1 assure ainsi la directionnalité des événements de fusion. A la surface de l'endosome, EEA1 a une conformation filamentaire « étirée », s'étirant jusqu'à 200 nm. La liaison avec Rab5 sur la vésicule distante induit un rétrécissement d'EEA1, permettant de rapprocher les vésicules avant leur fusion (Murray et al., 2016). Une mutation invalidant EEA1 entraîne l'agrégation des endosomes précoces à cause d'un déficit de fusion, non compensée par la suractivation de Rab5 (Lawe et al., 2002).

Rabenosyn-5 s'associe à la protéine Vps45 pour participer à l'ancrage et à la fusion des endosomes précoces. Comme EEA1, Rabenosyn-5 est recruté aux endosomes en liant Rab5 d'une part et PI(3)P via son domaine FYVE d'autre part (Nielsen et al., 2000). Certains effecteurs de Rab5 sont également des effecteurs d'autres Rabs de la voie endosomale. Par exemple, rabaptin-5 et rabenosyn-5 peuvent aussi lier Rab4 (Vitale et al., 1998, de Renzis et al., 2002).

Sur les endosomes précoces, le complexe CORVET représente la catégorie des facteurs d'ancrage multi-protéiques. Il est principalement associé à une sous-catégorie d'endosomes précoces : les endosomes APPL1-positifs (détaillés dans la section suivante) (Perini et al., 2014). Ce complexe d'ancrage est indépendant du PI(3)P et d'EEA1.

1.2.2.3 Diversité des endosomes précoces : exemple des endosomes de signalisation

L'endocytose des récepteurs transmembranaires permet de limiter la signalisation de ces récepteurs à la membrane plasmique en les isolant de leur ligand extracellulaire. Cependant, la signalisation existe aussi dans le système endosomal. Selon le couple récepteur-ligand, l'acidification du lumen des endosomes ne permet pas toujours de dissocier le ligand de son

récepteur, et la signalisation peut se poursuivre. Par exemple, certains récepteurs tyrosine-kinase comme le récepteur à l'Epidermal Growth Factor (EGF) stimulé par l'EGF spécifiquement restent phosphorylés et actifs dans les endosomes précoces (Sorkin and Von Zastrow, 2002, Villasenor et al., 2015). A l'inverse, la signalisation issue de cargos peut réguler l'endocytose. L'activation du récepteur à l'EGF peut ainsi augmenter le nombre de vésicules d'endocytose formées (Connolly et al., 1984), favoriser l'internalisation en activant Rab5 (Barbieri et al., 2000), et réguler la maturation des endosomes (White et al., 2006).

Les endosomes sont considérés comme des plateformes pouvant participer aux voies de signalisation cellulaires par l'intermédiaire de protéines adaptatrices (Palfy et al., 2012). Rab5 notamment interagit avec de nombreuses voies de signalisation. La découverte du rôle des protéines APPL (Adaptor Protein, Phosphotyrosine interacting with PH domain and Leucine zipper) a mis en lumière une population particulière d'endosomes précoces impliqués dans la signalisation. APPL1 et APPL2 sont des effecteurs de Rab5, qui le lient au niveau des domaines BAR et PH. APPL1 est recruté aux endosomes par Rab5, mais est très peu co-localisé avec EEA1. Après stimulation des cellules à l'EGF, APPL1 et APPL2 sont transportés au noyau où ils peuvent interagir avec un régulateur de la structure de la chromatine et de l'expression génique en interagissant avec un complexe histone désacétylase (Miaczynska et al., 2004). Il s'agit donc d'une population d'endosomes précoces différente de la vision canonique (endosome portant Rab5/Vps34/PI(3)P/EEA1/Rabenosyn-5). Les endosomes APPL1-positifs étaient considérés comme une étape intermédiaire avant la conversion en endosomes EEA1-positifs (Zoncu et al., 2009), mais une étude a démontré qu'ils constituent un compartiment à part entière (Kalaidzidis et al., 2015). Les endosomes précoces APPL1-positifs sont spécialisés dans la régulation de voies de signalisations spécifiques des cargos qu'ils transportent, grâce à des interactions avec de nombreuses protéines de la signalisation cellulaire (Diggins and Webb, 2017).

Cet exemple montre que les endosomes précoces ne forment pas une population de vésicules homogènes. Au-delà des populations d'endosomes impliquées dans le tri, le recyclage, la dégradation des cargos ou la voie de biosynthèse, le compartiment endosomal présente une variété de sous-populations et de fonctions notamment de signalisation cellulaire. Les marqueurs classiques de l'endosome précoce canonique (Rab5/EEA1) sont donc limités quand il s'agit de caractériser expérimentalement ce compartiment, car ils en reflètent mal la diversité et les stades de maturation. Par exemple, Rab5 et EEA1 ne sont que partiellement co-localisés

dans les fibroblastes, les endosomes Rab5-positifs étant plus précoces et périphériques que les endosomes EEA1-positifs (figure 5). Cette maturation des endosomes précoces est en effet accompagnée d'un changement de localisation, comme le démontre la localisation Rab5-dépendante des endosomes précoces dans le cytoplasme (Stenmark et al., 1994). Il est important d'ajouter que des microdomaines de Rab différentes peuvent co-exister à la surface d'un endosome (Sonnichsen et al., 2000), permettant de compartimentaliser le recrutement des effecteurs et les fonctions qui en découlent. En conclusion, bien que l'on puisse dégager de grandes populations, les endosomes précoces ont une identité moléculaire plurielle et dynamique.

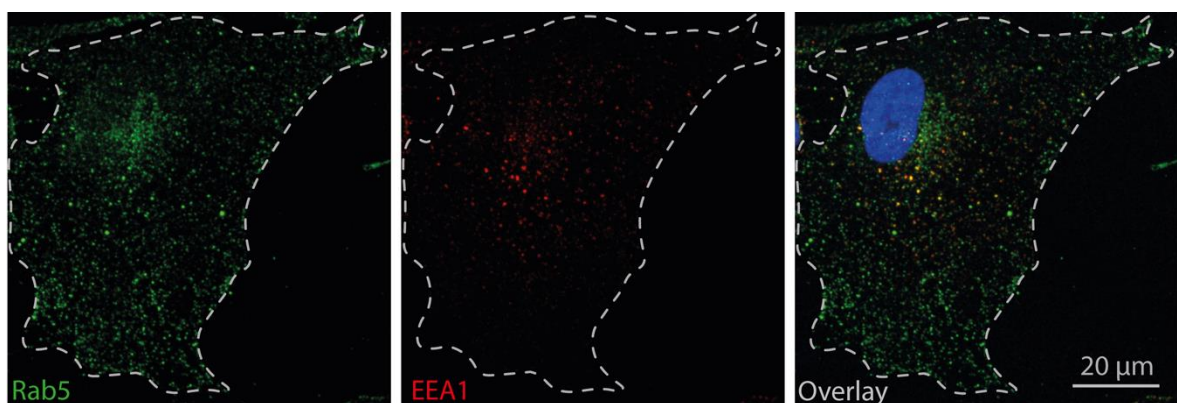


Figure 5. Populations d'endosomes précoces

Images de microscopie confocale montrant un immuno-marquage Rab5 (vert) et EEA1 (rouge) dans un fibroblaste d'individu contrôle. Ce co-marquage montre que les endosomes précoces Rab5-positifs et EEA1-positifs désignent des populations différentes. Les endosomes Rab5-positifs sont localisés dans la totalité du cytoplasme, alors que les endosomes EEA1-positifs sont rarement localisés en périphérie et sont plutôt situés dans la région péri-nucléaire (DAPI, bleu).

1.3 Voies de sortie de l'endosome précoce

1.3.1 Maturation vers la voie de dégradation

Endosome tardif / Corps multivésiculaires. Les cargos ubiquitynilés suivent la voie de maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs puis en lysosome pour y être dégradés

(figure 6). Ce processus débute dans la partie vacuolaire de l'endosome précoce (par opposition aux tubules). Les récepteurs situés à la membrane limitante de l'endosome précoce sont séquestrés dans des vésicules libérées dans la lumière de l'endosome après invagination de la membrane (Miller et al., 1986). Ce sont les ILV. Les endosomes précoces comportent déjà quelques ILV. L'augmentation du nombre d'ILV caractérise l'endosome tardif, également appelé corps multivésiculaire (MVB). Les MVB sont généralement plus gros que les endosomes précoces. Cette augmentation de taille donnerait accès à une plus grande quantité de membrane disponible pour générer les ILV.

La transition entre endosome précoce et MVB est marquée par la conversion Rab5/Rab7 (Rink et al., 2005). Rab7 y est recruté et activé par la Rab7-GEF Mon1-Ccz1 (Kinchin and Ravichandran, 2010, Nordmann et al., 2010). Parallèlement, la Rab5-GEF Rabex-5 quitte l'endosome précoce, rompant la boucle de rétrocontrôle positif assurant la production de Rab5. Des domaines Rab7 se forment alors, recrutant des effecteurs tels que le complexe HOPS et le complexe du rétromère (détaillé en section 1.3.2) pour réguler spécifiquement le trafic et la fusion des endosomes tardifs (Rojas et al., 2008, Seals et al., 2000). Les propriétés de l'endosome sont donc fondamentalement modifiées par cet échange de Rab.

L'ubiquitynilation des cargos entraîne leur tri vers la voie de dégradation. La reconnaissance et le regroupement des cargos ubiquitynilés sur l'endosome précoce est médiée par la machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) (Katzmann et al., 2001, Wollert and Hurley, 2010). Les complexes ESCRT ont à la fois un rôle de tri des cargos et un rôle de remodelage de la membrane de l'endosome. Hrs est un effecteur bien caractérisé du PI(3)P qui est recruté à la membrane des endosomes par la liaison de son domaine FYVE au PI(3)P (Raiborg et al., 2001). Il porte un motif d'interaction avec l'ubiquitine et s'associe à la protéine STAM (Signal Transducing Adapter Molecule 1), formant ainsi le complexe ESCRT-0 qui regroupe les cargos ubiquitynilés sur la membrane de l'endosome (Bache et al., 2003a, Bache et al., 2003b). Les complexes ESCRT-I, et -II initient l'invagination de la membrane limitante au niveau des cargos ubiquitynilés (Wollert and Hurley, 2010), et ESCRT-III permet la fission entre la membrane limitante et l'ILV (Wollert et al., 2009). Enfin, l'AAA-ATPase Vps4 termine le processus en dissociant la machinerie ESCRT.

Le changement d'identité en phosphoinositides marque également une étape dans la maturation des endosomes précoces. Lors de la maturation en MVB, le PI(3)P peut être dégradé ou changer

de localisation. En effet, les ILV sont PI(3)P-positive car elles émanent de la membrane des endosomes précoces (Gillooly et al., 2000). Les ILV présents dans les endosomes tardifs sont LBPA-positifs (LysoBisPhosphatidic Acid), un lipide caractéristique de ce compartiment (Kobayashi et al., 1998, Kobayashi et al., 2002). A la membrane limitante, le PI(3)P est le substrat de la kinase PIKfyve qui le convertit en PI(3,5)P₂ (Sbrissa et al., 2002, Ikononov et al., 2006, McCartney et al., 2014). Vps34 est également activé par Rab7-GTP (Stein et al., 2003, Stein et al., 2005). Cette production locale de PI(3)P permet le recrutement de phosphatases portant un domaine FYVE (famille des myotubularines) qui entraîneraient la dégradation de PI(3)P et l'inhibition de Vps34 (Cao et al., 2008). Il a récemment été montré que Vps34 peut limiter l'activation de Rab5 par l'intermédiaire d'une Rab-GAP (Law et al., 2017), participant ainsi à la dissociation des microdomaines Rab5/PI(3)P. Les kinases qui synthétisent les phosphoinositides PI(3)P et PI(3,5)P₂ de la voie endosomale sont donc impliquées dans le processus de maturation. La PI 3-K Vps34 endosomale est requise lors de la formation des ILV contenant le récepteur à l'EGF (Futter et al., 2001). L'inhibition de PIKfyve induit une vacuolisation anormale, accompagnée d'un défaut d'acidification et des anomalies de dégradation du récepteur à l'EGF (Jefferies et al., 2008, de Lartigue et al., 2009), ainsi qu'une activité protéolytique réduite dans les lysosomes (Kim et al., 2014). PIKfyve et la génération de PI(3,5)P₂ sont donc importants pour la maturation des endosomes en MVB et la dégradation de cargos.

Lysosomes. Les MVB/endosomes tardifs poursuivent leur maturation en formant un compartiment hybride, l'endo-lysosome. Il résulte des fusions/fissions transitoires entre endosomes tardifs et lysosomes (Bright et al., 2005). Les cargos à dégrader sont transportés jusqu'au lysosome. En microscopie électronique, les lysosomes ont un contenu dense dont l'aspect varie selon le type de molécule à dégrader (Klumperman and Raposo, 2014) (figure 3). Ils sont chargés en hydrolases acides telles que les cathépsines, et sont marqués par les protéines LAMP 1 et 2 à leur membrane.

Acidification. Au-delà des changements d'identité moléculaire, la maturation du système endosomal repose également sur l'acidification du pH intraluminal. Les endosomes précoces ont un pH intraluminal d'environ 6,5, les endosomes tardifs ont un pH d'environ 5,5 et les lysosomes ont un pH d'environ 4,5/5. Cette acidification repose sur l'action de pompes à proton vacuolaires (V-ATPases), qui utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour transporter des protons dans la lumière de la vésicule (Galloway et al., 1983). L'acidification

du pH a plusieurs fonctions : dissocier les complexes ligands-récepteur, établir un environnement favorable à l'activité des hydrolases acides dans les lysosomes, réguler le trafic et la maturation des endosomes.

Exosomes. Les MVB peuvent être détournés de la voie de dégradation et être transportés vers la membrane plasmique pour y fusionner. La fusion des MVB avec la membrane plasmique grâce aux complexes SNARE entraîne la sécrétion des ILV dans le milieu extracellulaire, qui deviennent ainsi des exosomes. Des co-facteurs de la machinerie ESCRT comme ALIX (ALG-2-interacting protein X) ou TSG101 (Tumor Susceptibility Gene 101 protein) sont des marqueurs typiques des exosomes. Les exosomes ont une composition variable de protéines, lipides et ARN (Acide RiboNucléique), et peuvent interagir avec des cellules cibles plus ou moins éloignées dans l'organisme pour en modifier la physiologie. La variation des cargos transportés par les exosomes dans le cadre pathologique en font une cible d'intérêt croissant dans la recherche de biomarqueurs spécifiques (Sardar Sinha et al., 2018, Hamlett et al., 2018). La manipulation de leur composition est également étudiée dans le développement d'outils thérapeutiques (Colombo et al., 2014).

1.3.2 Recyclage

Les cargos internalisés et transportés jusqu'aux endosomes précoces peuvent être redirigés vers la membrane plasmique par les voies de recyclage (figure 7). Deux grandes voies de recyclage ont été identifiées : la voie rapide et la voie lente. La voie rapide est basée sur la tubulation de la membrane des endosomes précoces, sous contrôle de Rab4. Les récepteurs à recycler y sont dirigés puis transportés directement à la membrane plasmique. La voie lente fait intervenir un compartiment intermédiaire Rab11-positif : les endosomes de recyclage (dont le réseau forme l'ERC, Endocytic Recycling Compartment). Initialement découvert dans la machinerie du transport rétrograde (Seaman et al., 1998), le complexe du rétromère intervient également dans le tri des cargos vers la membrane plasmique (figure 6) (Temkin et al., 2011). Le complexe du rétromère est composé de l'assemblage de deux modules. Le premier module est composé d'un hétérodimère de SNX (Sorting NeXin) qui permet le recrutement du complexe à la membrane endosomale par liaison de leur domaine PX au PI(3)P, ainsi que la tubulation de la membrane endosomale (Burda et al., 2002, Cozier et al., 2002). En plus de leur domaine PX, les SNX peuvent porter d'autres domaines leur conférant une spécificité pour certains cargos ou

certaines fonctions (Wang et al., 2018). Le second module est composé d'un trimère Vps26-Vps29-Vps35 chez les mammifères, qui assure la reconnaissance des cargos à trier vers la membrane plasmique ou le TGN (section suivante) et les dirige vers les extensions tubulaires de l'endosome SNX-dépendantes (Carlton et al., 2004, Bonifacino and Hurley, 2008, Temkin et al., 2011). Parmi les molécules empruntant les voies de recyclage, la transferrine et son récepteur ont été particulièrement étudiés. Ce sont des outils classiques d'étude de la cinétique du recyclage.

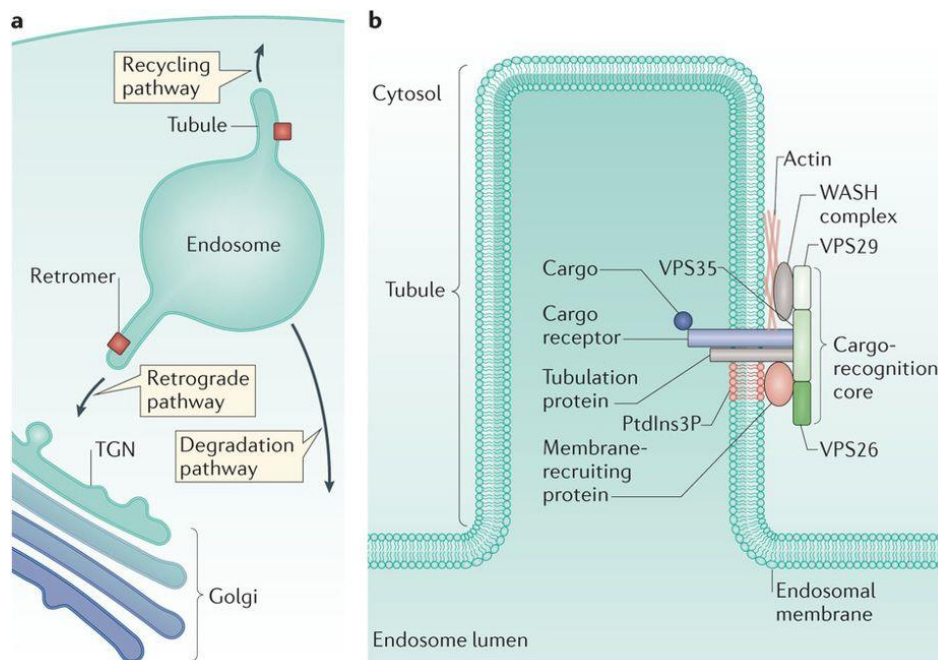


Figure 6. Complexe du rétromère

a. Le rétromère est impliqué dans le tri des cargos vers les voies de recyclage et de transport rétrograde. Il est situé à la membrane des tubules des endosomes précoces b. Le complexe du rétromère est composé de nombreuses protéines formant des modules fonctionnels. Les SNX sont retrouvées dans les modules de « tubulation protein » et « membrane-recruiting protein », et les Vps26, 29 et 35 forment le module de reconnaissance des cargos. Le recrutement du complexe WASH permet de remodeler l'actine à la surface des tubules. D'après (Small and Petsko, 2015).

1.3.3 Transport rétrograde

Le transport rétrograde désigne les échanges entre les différents compartiments endosomaux (endosome précoce, tardif, de recyclage) et les compartiments de biosynthèse et de sécrétion (figure 7). De nombreuses protéines et lipides sont transportés entre les endosomes et le TGN. Par exemple, des récepteurs internalisés peuvent être recyclés vers le TGN. Le rétromère est

central dans le tri de ces cargos (Bonifacino and Hurley, 2008). A l'inverse, des protéines comme les précurseurs d'hydrolases peuvent être incorporées aux endosomes depuis le TGN en prévision de la dégradation de cargos dans les lysosomes. Cette voie a été principalement mise en évidence grâce à l'étude des récepteurs mannose-6-phosphate, qui lient les enzymes lysosomales dans le TGN et participent à leur transport vers les lysosomes. Les échanges entre endosomes et TGN sont donc bidirectionnels, et certaines protéines suivent un transport cyclique entre les deux compartiments (certaines SNAREs par exemple) (Lewis et al., 2000).

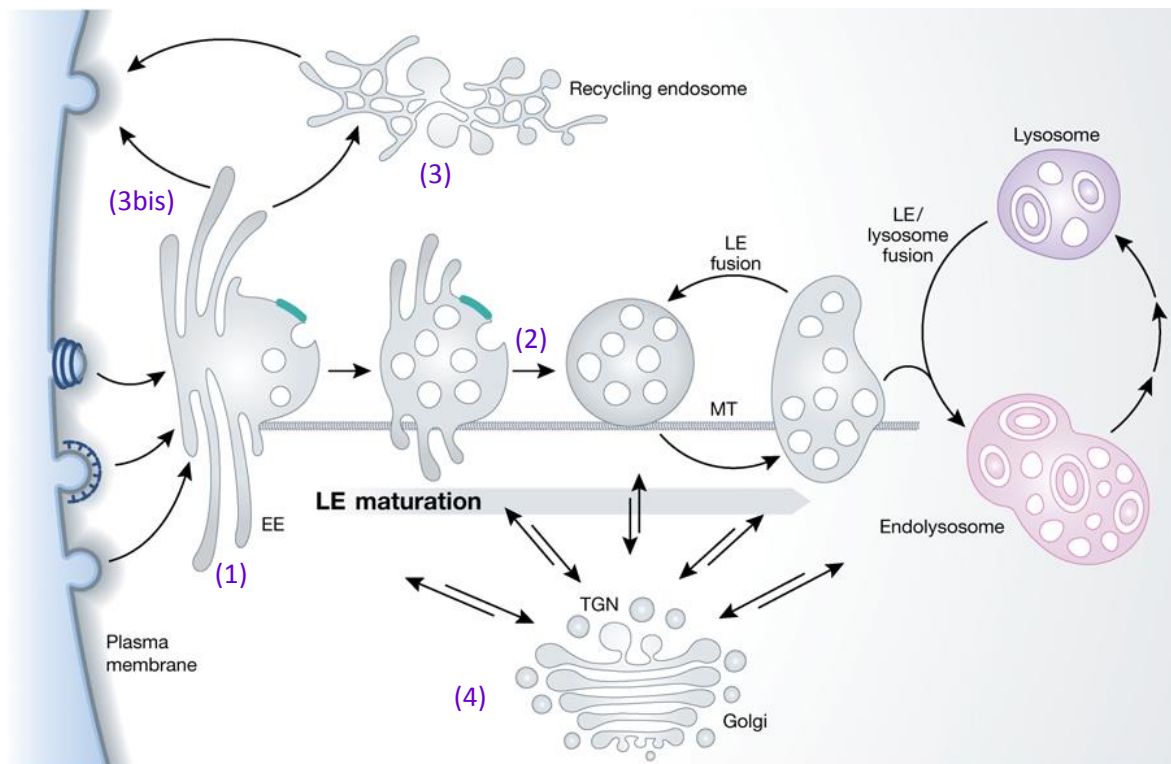


Figure 7. Voies de sortie de l'endosome précoce

Après avoir été transportés vers l'endosome précoces (EE) (1), les cargos ont plusieurs issues possibles : (2) La voie de dégradation, qui correspond à la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs (LE), endolysosome et lysosome en étant transportés sur les microtubules (MT). (3) La voie de recyclage lente vers la membrane plasmique passant par les endosomes de recyclage, ou (3bis) la voie de recyclage rapide et directe entre l'endosome précoce et la membrane plasmique. (4) Le transport rétrograde de l'endosomes vers le réseau trans-golgien (TGN), qui se fait à plusieurs niveaux de la voie endosomale. D'après (Huotari and Helenius, 2011).

1.4 Interactions avec le cytosquelette

Le cytosquelette et les protéines motrices sont à la base de la motilité des endosomes dans la cellule, et participent à des événements cruciaux de remodelage de la membrane et de tri des cargos. Il existe un lien clair entre le fonctionnement et le mouvement des endosomes, car l'évolution des endosomes se fait dans un cadre spatio-temporel finement régulé. Les vésicules d'endocytose nouvellement formées sont transportées dans la périphérie de la cellule par l'actine corticale grâce aux myosines. Les endosomes sont ensuite transportés sur les microtubules par les kinésines et la dynéine. Les kinésines sont dirigées vers le pôle positif des microtubules (transport antérograde, vers la membrane plasmique) et la dynéine vers le pôle négatif des microtubules (transport rétrograde, vers le centrosome, près du noyau). De manière générale, le processus de maturation s'accompagne d'un mouvement globalement rétrograde des endosomes vers la région périnucléaire, bien que les endosomes suivent des mouvements bi-directionnels (Huotari and Helenius, 2011, Nielsen et al., 1999). Aux endosomes précoces, Rab5 et Vps34 régulent les mouvements des endosomes précoces sur les microtubules (Nielsen et al., 1999).

Les filaments d'actine et les microtubules jouent un rôle majeur dans les événements de fission endosomale. WASH (membre de la famille des protéines Wiskott Aldrich syndrome) est présent sous la forme de microdomaines aux membranes des différents compartiments de la voie endo-lysosomale. Il y active le complexe Arp2/3 qui permet la polymérisation de l'actine en créant un nouveau point de nucléation (Derivery et al., 2009, Gomez and Billadeau, 2009). Quand WASH est invalidé, les endosomes forment des tubulations qui ne se scindent pas, entraînant un tri anormal des cargos vers les différentes voies (Gautreau et al., 2014). La scission serait alors dynamine-dépendante, de manière similaire à la scission de la vésicule d'endocytose à la membrane plasmique (Derivery et al., 2009).

Les moteurs moléculaires ont une influence sur le tri des cargos et le fonctionnement des endosomes. Le complexe WASH s'associe au rétromère (Harbour et al., 2010) et active Arp2/3 pour favoriser la polymérisation de l'actine au niveau des tubules. Cette association permet le tri des cargos au niveau du rétromère vers le TGN ou la membrane plasmique (Seaman et al., 2013). La dynéine participe au tri entre la voie de recyclage pour la transferrine et la voie de dégradation pour le récepteur à l'EGF (Driskell et al., 2007). Au niveau des kinésines, KIF16B lie le PI(3)P endosomal et son activité influe sur la route empruntée par les endosomes et leurs

cargos. En effet, la déplétion KIF16B séquestre les endosomes précoces dans la région péri-nucléaire et compromet le recyclage de la transferrine, alors que sa surexpression entraîne l'accumulation des endosomes précoces en périphérie et altère la dégradation du récepteur à l'EGF (Hoepfner et al., 2005). Dans les endosomes de recyclage, la tubulation de la membrane est Rab11-dépendante, et fait intervenir la kinésine KIF13 afin de faire progresser les tubules membranaires sur les microtubules. Elle module également l'adressage du récepteur à la transferrine dans ces tubules (Delevoye et al., 2014).

2. Maladie d'Alzheimer et trisomie 21

2.1 Maladie d'Alzheimer

2.1.1 Généralités

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui se caractérise par des troubles de la mémoire récente et un déclin des fonctions cognitives exécutives. Elle est la cause de démence la plus importante (60 à 70 % des cas de démence, Organisation Mondiale de la Santé). Dans les pays occidentaux, la prévalence de la maladie a tendance à augmenter en raison de l'allongement de la durée de vie, alors que l'incidence semble reculer. En France, environ 900.000 personnes sont touchées par la maladie d'Alzheimer et on estime ce chiffre à 1,3 millions en 2020. La maladie se déclare principalement après 65 ans (2 à 4 % de la population) et avec une prévalence maximale à 80 ans (environ 15 % de la population) (Inserm 2019).

Auparavant, le diagnostic de maladie d'Alzheimer ne pouvait être posé avec certitude qu'après le décès du patient, par observation des lésions neuropathologiques dans le cerveau. Aujourd'hui, le diagnostic de la maladie repose sur une série de tests et d'analyses. Les troubles cognitifs sont mesurés par des évaluations neuropsychologiques (mémorisation, langage, raisonnement). Le diagnostic est complété par l'imagerie cérébrale. L'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) structurale permet de déterminer s'il y a une atrophie du lobe temporal médian où se trouve l'hippocampe et d'exclure d'autres pathologies (tumeurs, accident vasculaire cérébral...). La TEP (Tomographie par Émission de Positrons) permet de mesurer l'activité métabolique qui est abaissée dans le néocortex en cas de maladie d'Alzheimer, et d'imager directement les lésions neuropathologiques amyloïdes et depuis récemment tau. Enfin, on peut évaluer les niveaux de biomarqueurs dans le liquide céphalo-rachidien (baisse d'A β ₄₂, augmentation de Tau et Tau phosphorylée) qui indiquent le développement des lésions dans le cerveau.

A ce jour, aucun traitement curatif n'a été validé pour le traitement de la maladie d'Alzheimer. Des inhibiteurs de cholinestérase et des antagonistes de récepteurs NMDA

(N-méthyl-D-aspartate) sont indiqués comme traitement symptomatiques, avec des effets modérés et dont l'intérêt est discuté (Ballard et al., 2011). Aujourd'hui, l'enjeu majeur est de mettre au point un diagnostic précoce. La prise en charge des patients au plus tôt permet de limiter les troubles cognitifs et d'anticiper l'évolution de la maladie.

2.1.2 Lésions neuropathologiques

2.1.2.1 Pathologie amyloïde

Une des marques de la maladie d'Alzheimer est le dépôt anormal extracellulaire de peptides amyloïdes ($A\beta$). Les peptides amyloïdes produits à tout âge ne sont pas tous toxiques mais leur fonction physiologique reste peu décrite. Les peptides amyloïdes qui constituent les plaques résultent de clivages protéolytiques de l'APP (Amyloid Precursor Protein), détaillés en section 2.3.1. Les peptides $A\beta$ ainsi produits sont initialement monomériques. Ils s'associent ensuite en oligomères solubles puis en fibrilles insolubles dont l'agrégation forme des dépôts ou plaques séniles (figure 8a, b). Ces dépôts sont être généralement focaux ou diffus, et leur caractère amyloïde est déterminé par coloration Rouge Congo ou Thioflavine S. (Duyckaerts et al., 2009). Les dépôts d' $A\beta$ sont enrichis en forme $A\beta_{42}$ (Iwatsubo et al., 1994). L'oligomérisation de l' $A\beta$ aurait lieu dans les compartiments intracellulaires des neurones suite au clivage de l'APP, avant d'être libéré dans le milieu extracellulaire (Takahashi et al., 2004). Depuis quelques années, les oligomères d' $A\beta$ font l'objet d'un intérêt particulier car de nombreuses études montrent qu'ils seraient plus toxiques que les dépôts d' $A\beta$ (Lambert et al., 1998, Viola and Klein, 2015).

Les dépôts d' $A\beta$ sont localisés dans le parenchyme cérébral. Il arrive qu'ils soient également présents dans la paroi des vaisseaux sanguins du cerveau. La maladie d'Alzheimer est alors associée à une angiopathie amyloïde (Duyckaerts et al., 2009). La localisation des dépôts d' $A\beta$ parenchymateux évolue de manière stéréotypée au cours de la maladie et définit les phases de Thal : la pathologie amyloïde débute dans le néocortex, puis progresse vers le cortex entorhinal, le diencephale, le tronc cérébral et le cervelet (Thal et al., 2002).

2.1.2.2 Pathologie tau

La protéine tau appartient à la famille des MAP (Microtubule Associated Proteins). L'épissage alternatif de l'ARN messager aboutit à la formation d'isoformes comprenant trois ou quatre répétitions (3R ou 4R) du domaine de liaison aux microtubules. Tau participe à la stabilisation du réseau de microtubule dans les neurones (Drubin and Kirschner, 1986, Goedert et al., 1989), permettant le maintien de la structure des neurones et assurant le transport axonal. La forme phosphorylée de tau diminue son affinité pour les microtubules (Lindwall and Cole, 1984). Dans la maladie d'Alzheimer, la protéine tau est anormalement hyperphosphorylée, déstabilisant et dépolymérisant ainsi le réseau de microtubules. L'état de phosphorylation de tau est lié à plusieurs kinases et phosphatases. Les kinases GSK-3 (Glycogen Synthase Kinase 3) ou CDK-5 (Cyclin-Dependent Kinase 5) ont notamment été identifiées comme dérégulées dans la maladie d'Alzheimer (Buee et al., 2000, Calderon-Garciduenas and Duyckaerts, 2017). Les protéines tau hyperphosphorylées s'agrègent dans les compartiments somato-dendritiques et axonaux des neurones sous forme de PHF (Paired Helical Filament) et l'accumulation de PHF forme les dégénérescences neurofibrillaires (Delacourte and Defossez, 1986, Duyckaerts et al., 2009, Grundke-Iqbal et al., 1986, Ihara et al., 1986) (figure 8c, d).

L'évolution spatio-temporelle de la pathologie tau suit un schéma caractérisé par Heiko et Eva Braak, selon 6 stades de Braak (Braak and Braak, 1991). Contrairement à la pathologie amyloïde, l'évolution de la pathologie tau est corrélée à l'évolution des symptômes du patient. La pathologie suit un mouvement centrifuge, qui débute dans le cortex entorhinal et s'étend à l'hippocampe puis à l'isocortex (Braak and Braak, 1991).

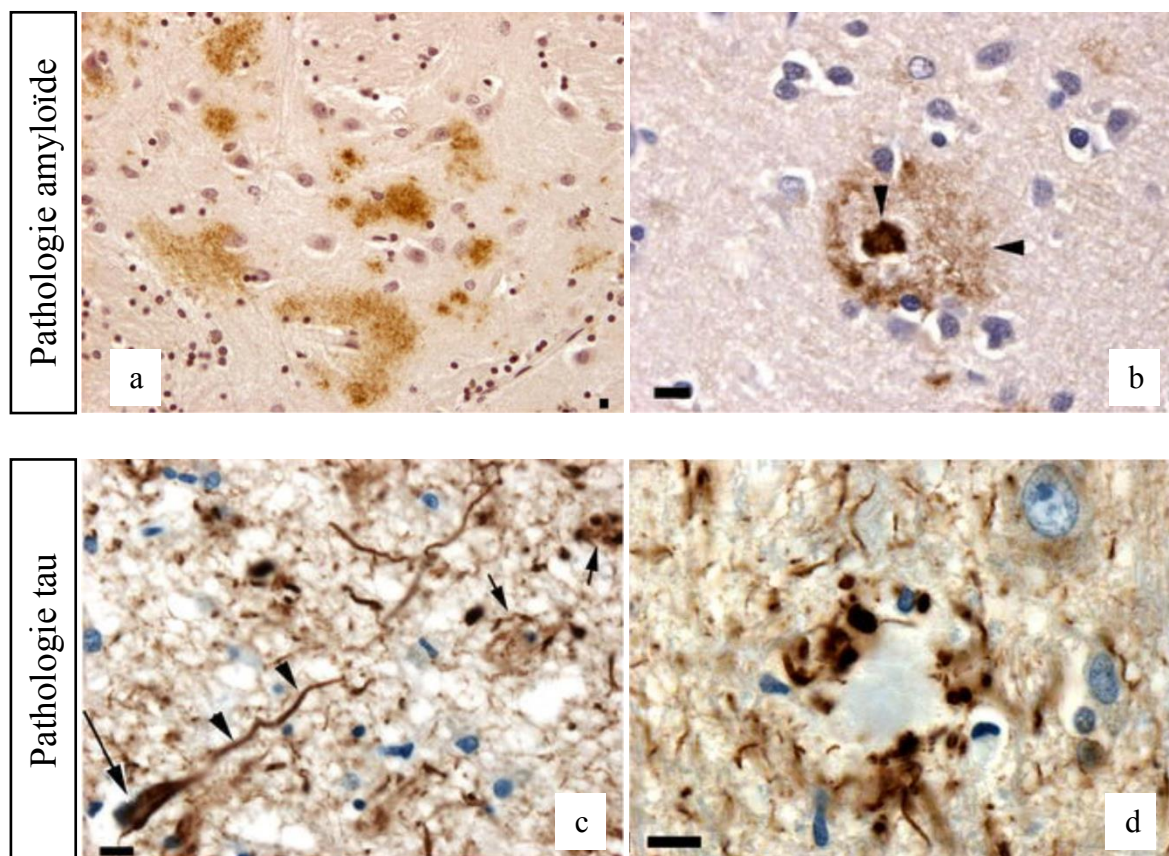


Figure 8. Lésions neuropathologiques dans la maladie d'Alzheimer

Pathologie amyloïde : (a) Dépôts diffus d'Aβ dans le striatum. (b) Plaque sénile constituée d'un cœur amyloïde (flèche de gauche) entouré d'une couronne de peptide Aβ. Barres d'échelle = 10 μm.

Pathologie tau : (c) Dégénérescence neurofibrillaire de tau hyperphosphorylée dans le corps cellulaire et la dendrite. (d) Axones tau-positifs constituant la couronne d'une plaque sénile, dont le cœur amyloïde n'est pas marqué. D'après (Duyckaerts et al., 2009).

2.1.3 Etiologie

2.1.3.1 Formes sporadiques et familiales

La grande majorité des cas (> 90 %) de maladie d'Alzheimer intervient après l'âge de 65 ans. Il s'agit généralement de formes sporadiques de la maladie, aux causes multiples mais dont des facteurs de risque génétiques ont été identifiés (voir section suivante). Elle peut cependant toucher des individus plus jeunes (~ 2 % à 10 % des cas de maladie d'Alzheimer), parfois

causées par la transmission de mutations autosomales dominantes dans des familles identifiées ou apparaissent *de novo*. Les formes familiales liées à des mutations représentent moins d'1 % des cas de maladie d'Alzheimer (Cacace et al., 2016), et sont caractérisées par la déclaration de la maladie à un âge plus jeune que les formes sporadiques. Les mutations associées à la maladie d'Alzheimer familiale concernent les gènes *APP*, *PSEN1* et *PSEN2*. Les gènes *PSEN1* et *PSEN2* codent pour les présénilines, membres du complexe γ -sécrétase participant au clivage de l'APP. Pour chacun de ces gènes, il existe plusieurs mutations ayant des effets à différents niveaux du clivage de l'APP et influençant la production de peptide amyloïde. Malgré la faible fréquence de ces mutations, elles mettent en avant le rôle de la pathologie amyloïde dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer. Aucune mutation liée à la pathologie tau n'a été identifiée jusqu'à présent dans la maladie d'Alzheimer. Elles existent néanmoins dans la démence fronto-temporale avec syndrome Parkinsonien (Goedert, 2005).

A ce jour, 58 mutations dans le gène de l'APP ont été identifiées (Alzforum.com), le plus souvent associées à la maladie d'Alzheimer. Les mutations dans le gène de l'APP sont situées au site du clivage β , au site du clivage γ , ou dans le domaine A β . A noter, il existe une mutation connue dans le gène de l'APP (A673T, dite mutation Icelandique) qui est protectrice contre la maladie d'Alzheimer (Peacock et al., 1993, Jonsson et al., 2012). Au-delà des mutations, il existe des duplications génomiques de tailles variables contenant le gène de l'APP, aboutissant à la surexpression du gène et l'augmentation de la production de peptide A β (Rovelet-Lecrux et al., 2006).

Après les mutations dans le gène de l'APP, des mutations dans les gènes *PSEN1* et *PSEN2* (présénilines 1 et 2) ont été découvertes. Les présénilines sont des sous-unités catalytiques du complexe γ -sécrétase qui intervient dans le clivage protéolytique de l'APP avant la libération de l'A β . A ce jour, 266 mutations ont été identifiées dans le gène *PSEN1* et 48 dans le gène *PSEN2* (Alzforum.com), avec une pathogénicité établie ou non. Les mutations *PSEN1* sont à l'origine de la majorité des formes familiales de maladie d'Alzheimer. Les mutations *PSEN* provoquent l'augmentation du ratio A β_{42} /A β_{40} , indicateur de pathogénicité (Kumar-Singh et al., 2006, Potter et al., 2013).

2.1.3.2 Facteurs de risque

Le facteur de risque principal pour le développement de la maladie d'Alzheimer est l'âge, mais de nombreux autres facteurs ont été identifiés, génétiques comme environnementaux (Barnes and Yaffe, 2011) (figure 9).

Le facteur de risque génétique principal est le polymorphisme du gène de l'*APOE*, dont l'allèle $\epsilon 4$ est associé à un risque augmenté de maladie d'Alzheimer. La présence d'un allèle $\epsilon 4$ augmente ce risque par 3, et l'homozygotie pour l'allèle $\epsilon 4$ augmente ce risque par 12 (Corder et al., 1993, Kuusisto et al., 1994, Saunders et al., 1993). L'allèle $\epsilon 4$ est surreprésenté dans la population touchée par la maladie d'Alzheimer : il est présent en au moins une copie chez 50 % des patients atteints de maladie d'Alzheimer, contre 20 à 25 % dans la population contrôle (Verghese et al., 2011). L'allèle $\epsilon 3$ n'influe pas sur le risque de développer la pathologie et l'allèle $\epsilon 2$ est protecteur contre la maladie (West et al., 1994). Bien que ces mécanismes ne soient pas totalement identifiés, l'allèle $\epsilon 4$ de l'*APOE* favoriserait principalement le développement de la maladie d'Alzheimer en influant sur le métabolisme et l'accumulation de peptide A β (Verghese et al., 2011, Dubois et al., 2018).

Par la suite, des études GWAS (Genome Wide Association Studies) ont mis en lumière de nombreux loci de susceptibilité pour la maladie d'Alzheimer, révélant des polymorphismes associés à la maladie d'Alzheimer, et parfois des niveaux d'expression modifiés. Certains de ces gènes codent pour des protéines impliquées dans l'endocytose et la voie endosomale : *BIN1*, *PICALM*, *SORL1* et *CD2AP* (Karch and Goate, 2015) (figure 9). Leurs rôles sont brièvement décrits ci-après.

BIN1 (Bridging integrator 1) est le second plus important locus de susceptibilité pour la maladie d'Alzheimer après *APOE*. *BIN1* est exprimé dans de nombreux tissus, dans lesquels ses différentes isoformes jouent des rôles variés, dont la régulation de l'endocytose (Prokic et al., 2014). En effet, l'isoforme de *BIN1* exprimée dans le cerveau peut lier la clathrine et AP2 par son domaine CLAP, indiquant un lien entre *BIN1* et endocytose clathrine-dépendante (Ramjaun and McPherson, 1998). *BIN1* interagit également avec le cytosquelette : il peut lier N-WASP par son domaine SH3, régulant ainsi la polymérisation de l'actine (Yamada et al., 2009) et son interaction avec la protéine tau pourrait être impliquée dans la maladie d'Alzheimer (Chapuis et al., 2013). Il a été montré récemment que *BIN1*, particulièrement exprimé dans les oligodendrocytes, s'accumule autour des dépôts amyloïdes dans le cerveau de souris modèles de la maladie d'Alzheimer (De Rossi et al., 2016, De Rossi et al., 2018).

PICALM (Phosphatidylinositol clathrin binding assembly protein) est impliqué dans la régulation de l'initiation de l'endocytose clathrine-dépendante car il permet le recrutement de l'AP2 et de la clathrine au niveau des puits de clathrine à la membrane plasmique. Il a été montré que la surexpression de PICALM augmente l'internalisation de l'APP et la production de peptides amyloïdes (Xiao et al., 2012). De plus, PICALM est associé à la tau hyperphosphorylée dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, de trisomie 21, et d'autres maladies neurodégénératives (Ando et al., 2013, Ando et al., 2016).

SORL1 (Sortilin related receptor L) est un membre de la famille des récepteurs Vps10, il interagit avec le complexe du rétromère (Dodson et al., 2006, Kimura et al., 2009, Lambert et al., 2013, Rogaeva et al., 2007). SORL1 lie l'APP, et la surexpression de SORL1 entraîne une diminution de la production de peptide A β en dirigeant l'APP vers la voie de recyclage par l'intermédiaire du rétromère (Rogaeva et al., 2007). Chez la souris, il a été montré que le « *silencing* » de SORL1 entraîne également une augmentation de la production d'A β (Dodson et al., 2008). Le niveau d'expression de SORL1 est réduit dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Scherzer et al., 2004). De plus, SORL1 est un récepteur de l'APOE (Yin et al., 2015).

CD2AP (CD2-associated protein) est une protéine chaperonne qui interagit avec le cytosquelette d'actine lors de l'endocytose et régule le trafic intracellulaire. Il régule l'adressage de l'APP vers la voie de dégradation en le dirigeant dans les vésicules intraluminales au niveau des endosomes précoces dendritiques et limite la colocalisation de BACE1 et APP dans les endosomes précoces, réduisant ainsi la production d'A β ₄₂ (Ubelmann et al., 2017).

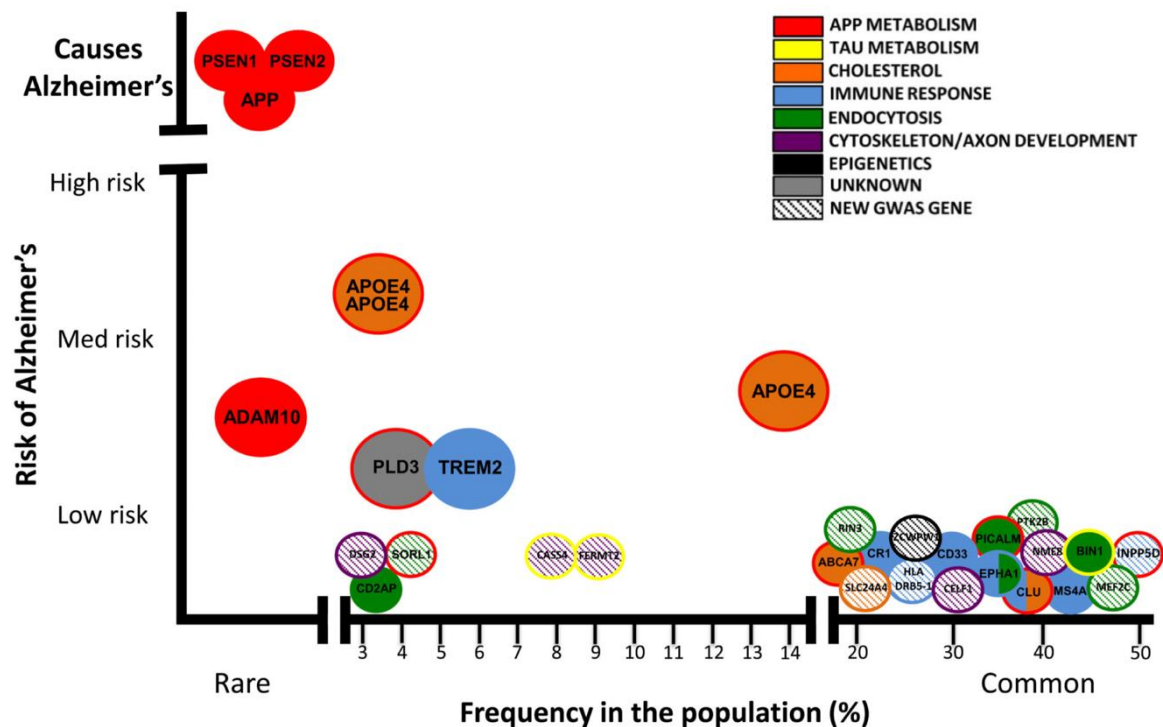


Figure 9. Facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer

Représentation des facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer, en fonction de leur fréquence dans la population (abscisse) et de la probabilité qu'ils représentent pour le développement de la maladie (ordonnée). Les facteurs de risque sont classés en fonction de la voie qu'ils touchent, les gènes liés à l'endocytose sont en vert. Les mutations monogéniques (APP, PSEN1, PSEN2) sont rares mais causales pour la maladie. De nombreux variants sont plus courants dans la population, et sont associés à un risque plus faible de développer la maladie. D'après (Karch and Goate, 2015).

2.2 Trisomie 21

2.2.1 Epidémiologie

La trisomie 21 (ou Down syndrome en anglais) est l'anomalie chromosomique la plus fréquente, ainsi que la principale cause de retard intellectuel d'origine génétique. Si la première description clinique de la trisomie 21, alors appelée « idiotie », date de Jean-Etienne Esquirol (1838), c'est en 1959 que Marthe Gautier et Jérôme Lejeune ont identifié que les cellules provenant d'enfants atteints de « mongolisme » présentaient une triplication du chromosome 21 (HSA21, Homo Sapiens 21) (Lejeune et al., 1959). En Europe, l'incidence de

la trisomie 21 est d'environ 1/1000 naissances (Khoshnood et al., 2011) et le risque d'avoir un fœtus porteur de trisomie 21 augmente avec l'âge de la mère (Yoon et al., 1996).

Il existe plusieurs types de trisomie 21 :

- Trisomie 21 libre, complète et homogène (95 % des cas) : elle est due à une anomalie de ségrégation du chromosome 21 lors de la méiose I ou II. Le chromosome 21 surnuméraire est entier et présent dans toutes les cellules de l'individu (figure 10).
- Trisomie par translocation (3 % des cas) : elle est due à la fusion de la totalité ou d'une partie du chromosome 21 sur un autre chromosome acrocentrique (13, 14, 15, 21 ou 22), elle est alors dite « robertsonienne ». Dans des cas plus rares, la translocation peut également être réciproque, où le bras long du chromosome 21 est échangé avec un fragment de tout autre chromosome.
- Trisomie partielle (2 % des cas) : elle est due à une triplification d'une partie seulement du chromosome 21, libre ou transloquée sur un autre chromosome.
- Trisomie en mosaïque : dans ce cas, une partie des cellules de l'organisme sont euploïdes et l'autre partie est trisomique. La trisomie en mosaïque est due à une anomalie mitotique lors des premières divisions du zygote, qui pouvait initialement être euploïde ou porteur d'une trisomie homogène. Le phénotype de l'individu est alors variable, il dépend de la proportion de mosaïcisme et de la répartition tissulaire des cellules trisomiques.

Les individus porteurs de trisomie 21 ont un large spectre de signes cliniques, touchant une grande partie des différents systèmes de l'organisme. Les anomalies observées sont très variables d'un individu à l'autre. Parmi les expressions phénotypiques principales de la trisomie 21, on peut citer le retard mental, la dysmorphie cranio-faciale, les malformations viscérales (cardiaques et digestives principalement) ou les dysfonctionnements du système immunitaire. Les individus porteurs de trisomie 21 sont également sujets au développement d'autres pathologies. Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons au développement de la maladie d'Alzheimer chez les individus porteurs de trisomie 21.

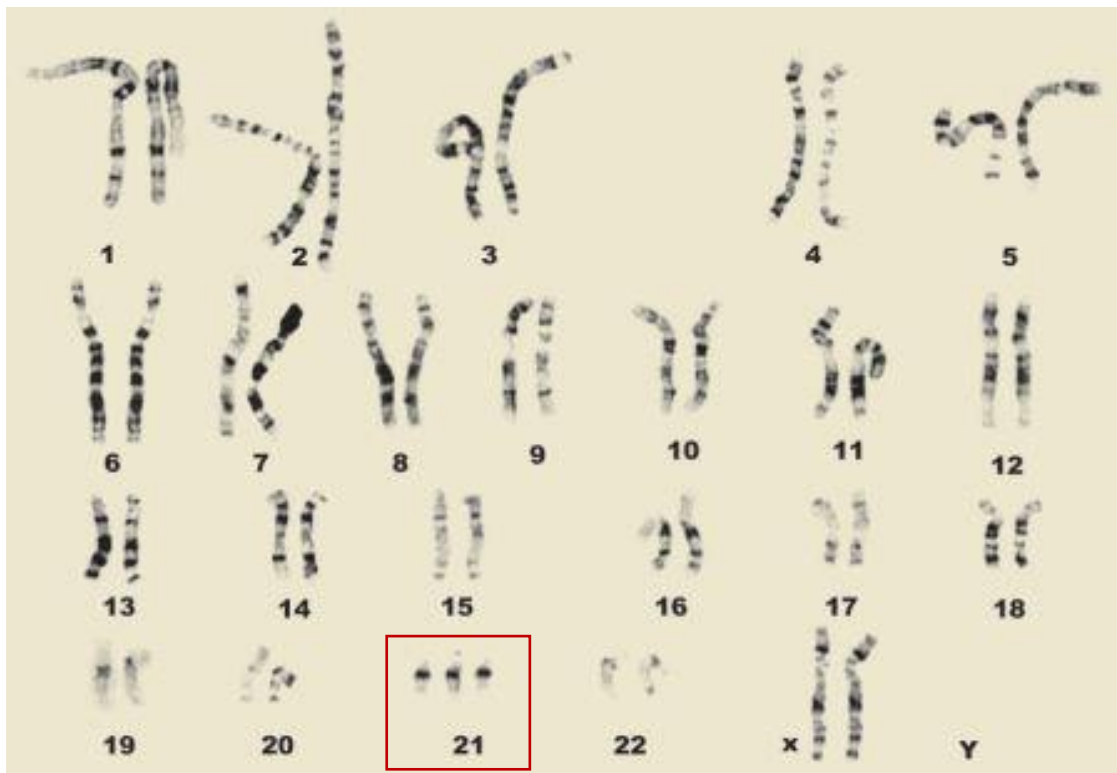


Figure 10. Caryotype de trisomie 21

Caryotype d'un individu de sexe féminin montrant la triplication du chromosome 21, caractérisant une trisomie 21 libre, complète et homogène (ndss.org).

2.2.2 Modèles murins de la trisomie 21

Le HSA21 possède des régions orthologues sur les chromosomes de souris 10, 16 et 17 (MMU10, 16 et 17). Le modèle murin de trisomie 21 le plus couramment utilisé est la souris Ts65Dn (Davisson et al., 1990, Reeves et al., 1995). La souris Ts65Dn a un mini chromosome excédentaire résultant d'une fusion entre la région du MMU16 orthologue au HSA21 et la

région centromérique du MMU17 (dont une partie n'est pas liée à la trisomie 21) (Duchon et al., 2011b). Le segment du MMU16 tripliqué dans la souris Ts65Dn porte le gène de l'*APP* et la région DSCR (Down Syndrome Critical Region, région critique du HSA21 identifiée par les corrélations phénotype-génotype, (Delabar et al., 1993). L'autre modèle murin principalement utilisé dans la trisomie 21 est la souris Ts1Cje. Cette souris présente une trisomie partielle du chromosome 16 excluant la région du gène *APP* (figure 11).

Ces souris ne sont donc trisomiques que pour une partie des gènes tripliqués dans la trisomie 21. Par exemple, la souris Ts65Dn possède 90 gènes orthologues à l'HSA21 tripliqués et a une triplication de 60 gènes non-liés à la trisomie 21. De plus, les gènes orthologues codés sur les MMU17 et 10 ne sont pas tripliqués dans cette souris. Le nouveau modèle Ts66Yah développé à l'IGBMC à Strasbourg par Yann Héroult n'a pas de triplication des 60 gènes supplémentaires, il constitue donc une amélioration de la souris Ts65Dn. Ce modèle reste à caractériser. Le développement de modèles comme la souris triple trisomique (Belichenko et al., 2015, Yu et al., 2010) et la souris présentant une duplication segmentale des MMU17 et 10 (Duchon et al., 2011a, Héroult et al., 2012) permettra certainement d'améliorer la compréhension de l'implication des gènes du HSA21 dans les phénotypes de la trisomie 21.

Dans le cadre de cette thèse, nous avons travaillé sur la souris Ts65Dn car ce modèle a été utilisé auparavant dans notre thématique de recherche (Cataldo et al., 2003).

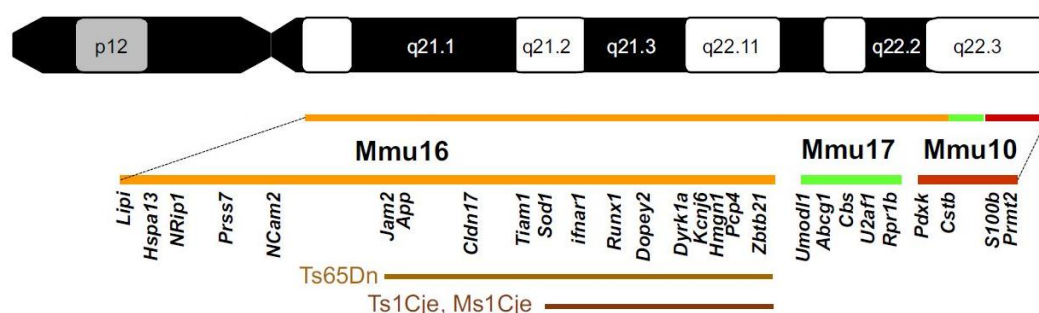


Figure 11. Modèles murins de la trisomie 21

Le chromosome 21 humain est représenté en haut (noir et blanc). Les régions orthologues dans le génome de souris sont représentées sur les Mmu16 (orange), 17 (vert) et 10 (rouge). Certains gènes de souris homologues aux gènes du HSA21 impliqués dans les phénotypes de la trisomie 21 sont indiqués sous les chromosomes. La souris Ts65Dn est le modèle le plus utilisé (marron clair). La souris Ts1Cje correspond à la triplication d'un segment plus court (marron foncé), excluant le gène *APP*. D'après (Héroult et al., 2017).

2.2.3 La maladie d'Alzheimer dans la trisomie 21

L'espérance de vie des individus porteurs de trisomie 21 n'a cessé d'augmenter au cours des dernières décennies, atteignant environ 60 ans aujourd'hui dans les pays développés (Bittles et al., 2007). Avec l'augmentation de l'espérance de vie, les individus porteurs de trisomie 21 sont confrontés à des pathologies liées à leur vieillissement, comme la maladie d'Alzheimer. Les individus trisomiques ont un risque élevé de développer la maladie d'Alzheimer. On estime que tous les individus porteurs de trisomie 21 ont les marques neuropathologiques permettant le diagnostic de la maladie d'Alzheimer à l'âge de 50 ans (Mann and Esiri, 1989). Des études anciennes montraient qu'à 70 ans, 100 % de la population trisomique a une démence de type maladie Alzheimer (Visser et al., 1997). Avec le développement des tests spécifiques à la population porteuse de trisomie 21 (Dekker et al., 2018), on estime maintenant que ce pourcentage serait inférieur (environ 80 % d'individus touchés à 65 ans) (Lott and Head, 2019) et certaines personnes âgées n'auraient pas de signe de déclin cognitif. L'évaluation clinique de la maladie d'Alzheimer chez les individus porteurs de trisomie 21 est plus difficile que dans la population générale, mais elle évolue continuellement.

Le développement des pathologies amyloïde et tau chez les individus porteurs de T21 est très documenté (Lott and Head, 2019, Rafii et al., 2017). La pathologie amyloïde apparaît en premier, d'abord sous forme de dépôts diffus puis de plaques amyloïdes. La présence d'A β ₄₂ soluble est détectée dans le cerveau d'individus porteurs de trisomie 21 dès le développement fœtal (Teller et al., 1996). Les dépôts amyloïdes sont observés dès l'enfance (cas positif de 8 ans), et s'aggravent avec le vieillissement (Leverenz and Raskind, 1998). L'apparition de la pathologie amyloïde chez les individus porteurs de trisomie 21 précède donc celle observée dans les cas de maladie d'Alzheimer sporadique de plusieurs décennies. Les individus porteurs de trisomie 21 ayant une maladie d'Alzheimer peuvent présenter une angiopathie amyloïde, comme observé dans les cas sporadiques et familiaux de maladie d'Alzheimer (Carmona-Iragui et al., 2017, Mann et al., 2018).

La pathologie tau apparaîtrait après la pathologie amyloïde dans la trisomie 21. Dans une étude récente utilisant pour la première fois l'imagerie PET tau chez des individus porteurs de trisomie 21, il est montré par PET A β + tau que tous les individus tau-positifs sont aussi A β -positifs, alors que certains individus sont A β -positifs et tau-négatifs (Rafii et al., 2017). En effet, les immunomarquages de tau phosphorylé (AT8) deviennent positifs dans l'hippocampe

d'individus porteurs de trisomie 21 entre 30 et 40 ans (Head et al., 2003), soit des années après le début de la pathologie amyloïde.

La trisomie 21 permet donc d'étudier des stades précoces de la maladie d'Alzheimer. La localisation du gène codant l'APP sur le chromosome 21 et l'apparition précoce de pathologie amyloïde dans le cerveau des individus porteurs de trisomie 21 désignent l'APP et l'A β comme sujets privilégiés à étudier pour comprendre le développement de la maladie d'Alzheimer, dans la population trisomique comme dans la population générale. C'est pourquoi nous allons nous concentrer sur le métabolisme de l'APP dans les sections suivantes.

2.3 Métabolisme et trafic de l'APP

2.3.1 Clivages, produits de clivage et peptide amyloïdes

Le gène de l'APP code pour 3 isoformes de tailles variables produites par épissage alternatif. Les isoformes APP₇₅₁ et APP₇₇₀ sont exprimées dans de nombreux types cellulaires non-neuronaux, alors que l'isoforme APP₆₉₅ est exclusivement exprimée dans les neurones (Sisodia et al., 1993). L'APP est une protéine transmembranaire de type I, dont le rôle physiologique est mal connu. Néanmoins, il a été montré que l'APP participe à de nombreux mécanismes tels que la LTP (Long-Term Potentiation) (Dawson et al., 1999, Seabrook et al., 1999), la neurogénèse, la croissance neuronale, l'adhésion cellulaires, la régulation des canaux ioniques et la neuroprotection (Muller and Zheng, 2012).

Après sa synthèse, l'APP immature subit de nombreuses modifications post-traductionnelles dans la voie sécrétoire, entre le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi : glycosylation, phosphorylation, palmitoylation, sumoylation, sulfation et ubiquitination (Wang et al., 2017). L'APP peut suivre deux voies de clivage : la voie non-amyloïdogénique et la voie amyloïdogénique (Haass and Selkoe, 1993) (figure 12). La voie non-amyloïdogénique débute avec le clivage de l'APP par l' α -sécrétase. Ce clivage ayant lieu dans le domaine de l'A β , il empêche la génération de ce peptide (Sisodia et al., 1990). Le clivage α génère un fragment membranaire (α -CTF, également appelé C83) et libère le fragment sAPP α (soluble APP α). Le fragment α -CTF est ensuite clivé par le complexe γ -sécrétase, libérant les fragments p3 et AICD (APP Intracellular Domain) (De Strooper and Annaert, 2010). La plupart de l'APP est clivée à la membrane plasmique dans la voie non-amyloïdogénique car l' α -sécrétase y est concentrée

(Sisodia, 1992). L'APP non-clivé à la membrane est internalisé dans la voie endosomale, et il va emprunter la voie de clivage amyloïdogénique dans les compartiments intracellulaires. La voie amyloïdogénique est initiée BACE1, β -sécrétase qui clive l'APP sur la partie N-terminale du domaine de l'A β (Sinha et al., 1999, Vassar et al., 1999). Cette étape est limitante dans la production d'A β . Le clivage β libère le fragment sAPP β (soluble APP β), laissant le fragment membranaire β -CTF (ou C99). Le clivage de ce fragment par la γ -sécrétase génère l'A β d'une part et l'AICD d'autre part. La γ -sécrétase est un complexe multi-protéique dont font partie les présénilines 1 et 2 (De Strooper et al., 1998, Herreman et al., 2000, Zhang et al., 2000). C'est le site de clivage γ qui détermine la taille du peptide A β , les deux formes majoritaires étant A β_{40} et A β_{42} (désignées par leur nombre d'acides aminés). La forme A β_{42} est plus hydrophobe que les formes courtes, favorisant son agrégation pathologique (Burdick et al., 1992). Elle est enrichie dans les plaques amyloïdes, augmentée dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, et elle est favorisée par les mutations dans les gènes de l'APP et des présénilines 1 et 2 associées aux maladies d'Alzheimer familiales (Scheuner et al., 1996, Iwatsubo et al., 1994, Kumar-Singh et al., 2006, Potter et al., 2013). Les mutations dans les gènes PSEN1 et PSEN2 favorisent la production d'A β_{42} et augmentent ainsi le ratio A β_{42} /A β_{40} (Borchelt et al., 1996, Scheuner et al., 1996), ce qui explique leurs rôles délétères dans la maladie d'Alzheimer.

Le peptide amyloïde est produit de manière physiologique par les cellules (Haass et al., 1992b, Shoji et al., 1992), et sa non-toxicité réside dans sa nature soluble et dans l'équilibre entre production et dégradation. C'est en effet l'agrégation de peptides entre eux qui marque le passage vers l'état pathologique, parce que la production totale augmente ou les formes insolubles (A β_{42}) augmentent en proportion, et la dégradation ne permet plus d'absorber ces changements néfastes. Au vu de l'échelle de temps nécessaire à l'établissement de la maladie, cette transition serait très lente. Une fois produit, le peptide A β est à l'état de monomère. Une succession d'étapes d'oligomérisation et de fibrillation aboutissent aux dépôts d'A β observé dans le cerveau atteint de maladie d'Alzheimer (LaFerla et al., 2007).

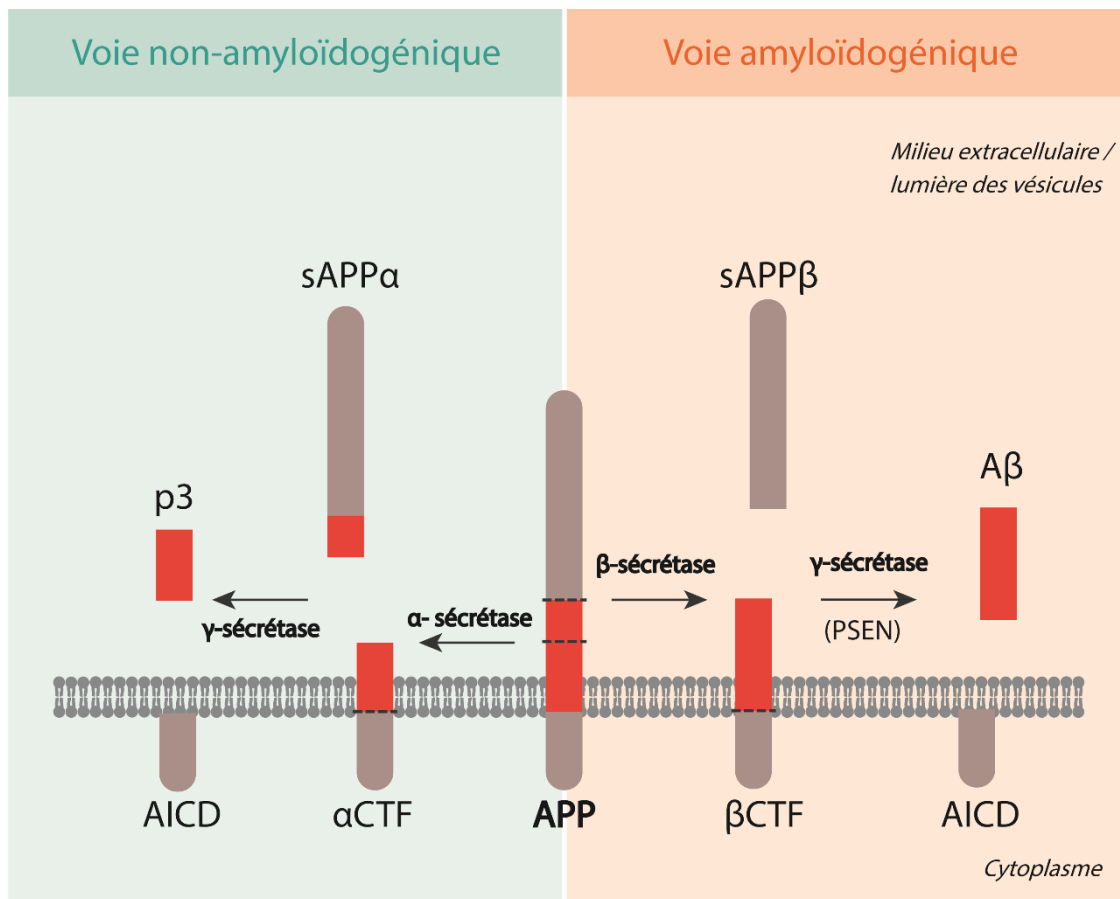


Figure 12. Clivages protéolytiques de l'APP

L'APP peut suivre la voie de clivage non-amyloïdogénique (gauche) et amyloïdogénique (droite). La voie amyloïdogénique, caractérisée par les clivages β et γ , conduit à la production de peptide A β .

2.3.2 Trafic intracellulaire

La majorité de l'APP synthétisée reste dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi, et une fraction (environ 10 %) est transportée vers la membrane plasmique par des vésicules sécrétoires. Le temps de résidence de l'APP à la membrane plasmique est court, car l'APP y est soit rapidement clivé par l' α -sécrétase (Sisodia, 1992), soit internalisé dans la voie d'endocytose (Haass et al., 1992a). L'internalisation de l'APP a lieu principalement par endocytose clathrine-dépendante, suite à la liaison de protéines adaptatrices au motif de tri YENPTY situé en C-terminal (Lai et al., 1995). Suite à son internalisation vers les endosomes précoces, l'APP peut alors suivre la voie de dégradation vers les lysosomes, être recyclé vers la membrane plasmique, ou suivre un transport rétrograde vers le TGN.

Le clivage de l'APP et la production d'A β dépendent de la colocalisation de l'APP et des sécrétases dans les compartiments intracellulaires. Après avoir été synthétisé, BACE1 est dirigé vers la membrane plasmique par la voie de sécrétion (figure 13). Dans la membrane plasmique, BACE1 est préférentiellement localisé dans les radeaux lipidiques (Hattori et al., 2006). Ce sont des domaines membranaires enrichis en cholestérol et sphingolipides, spécialisés notamment dans la concentration de molécules de signalisation (Sezgin et al., 2017). L'association entre l'APP et BACE1 au niveau des radeaux lipidiques semblent participer à la production d'A β (Cordy et al., 2003, Ehehalt et al., 2003, Marquer et al., 2011), bien qu'elle ne soit pas essentielle (Vetrivel et al., 2009). BACE1 est ensuite internalisé dans le compartiment endosomal suite à la liaison de protéines adaptatrices (familles des AP, Adaptor Proteins) au motif dileucine et plus largement à la séquence DDISLL sur la partie cytosolique de BACE1 (Huse et al., 2000, Prabhu et al., 2012, Kang et al., 2012). BACE1 porte également un motif ubiquitine, lui permettant d'être trié vers la voie de dégradation après son endocytose (Kang et al., 2010, Prabhu et al., 2012, Kang et al., 2012) et une phosphorylation dans sur la séquence DISLL lui permet d'être trié vers les endosomes de recyclage par l'intermédiaire du rétromère (Toh et al., 2018). L'activité protéolytique de BACE1 est optimale à pH acide (Vassar et al., 1999), ce qui correspond à l'environnement intraluminal des endosomes (Galloway et al., 1983). Le clivage β de l'APP est donc promu par la colocalisation de l'APP avec BACE1 dans les endosomes. Il a été démontré que l'interaction entre l'APP et BACE1 dans les endosomes conduit à l'accumulation de β -CTF dans la voie endo-lysosomale (Golde et al., 1992, Haass et al., 1992a, Kinoshita et al., 2003). Le complexe γ -sécrétase est actif dans la voie de sécrétion, à la membrane plasmique et dans la voie endo-lysosomale (Haass et al., 2012). Quand on prend en compte les caractéristiques des β - et γ -sécrétases, les endosomes apparaissent le site majeur de clivage amyloïdogénique de l'APP et de production d'A β . De plus, l'A β peut influencer négativement sur le fonctionnement de la voie endosomale. Il a été montré que l'accumulation d'A β dans les MVB de neurones de souris transgéniques APP perturbe le tri vers la voie de dégradation en modifiant l'activité de l'UPS (Ubiquitin-Proteasome System) (Almeida et al., 2006). Parallèlement, un défaut d'adressage de l'APP dans les MVB augmente la production d'A β (Morel et al., 2013). Par conséquent, des anomalies dans l'endocytose et le tri de l'APP dans la voie endosomale conduit à une production délétère d'A β (Cataldo et al., 2004, Cossec et al., 2010b, Koo and Squazzo, 1994, Miller et al., 2006, Perez et al., 1999).

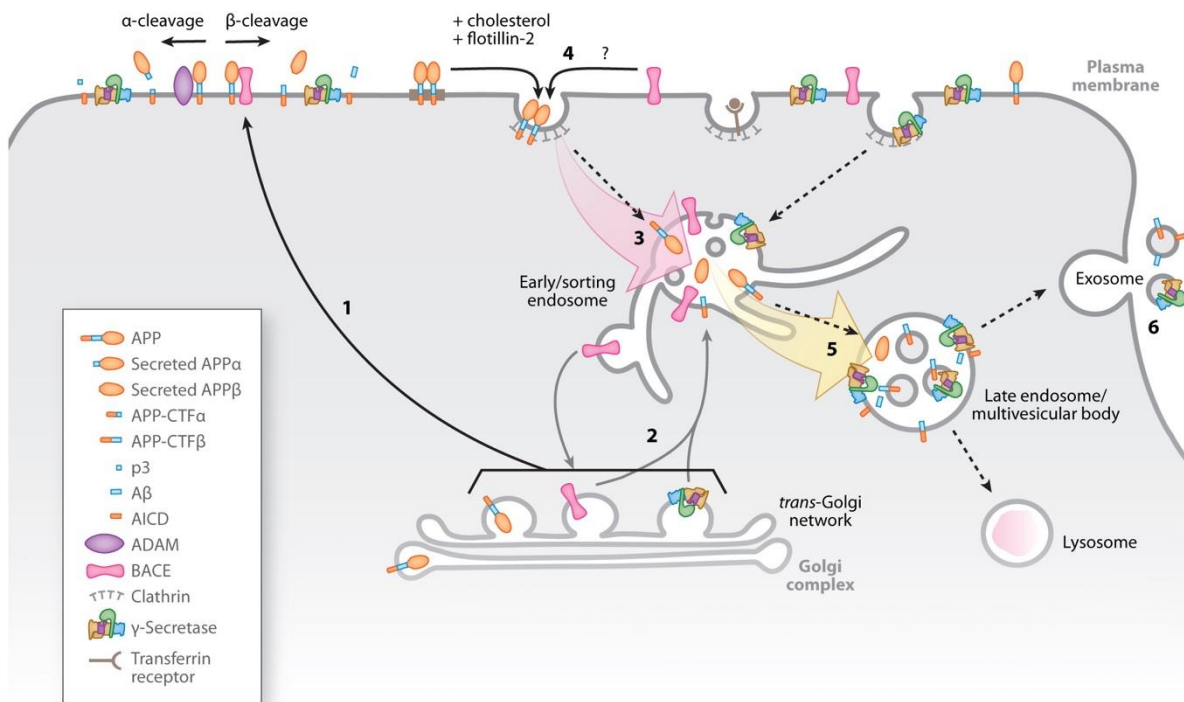


Figure 13. Trafic intracellulaire de l'APP

(1) Après modifications post-traductionnelles dans l'appareil de Golgi, l'APP mature et les sécrétases sont dirigés vers la membrane plasmique. Les clivages α et β peuvent y avoir lieu, mais le clivage α y est très majoritaire (2) BACE1 et le complexe γ -sécrétase peuvent être directement adressés au compartiment endosomal, puis être recyclé vers le TGN via le rétromère ou suivre la voie de dégradation. (3) L'APP localisé à la membrane plasmique est internalisé et rejoint les endosomes précoces, où il est clivé par les sécrétases. (5) Les produits de clivages contenus dans l'endosome précoces sont dirigés vers les MVB/endosomes tardifs, d'où ils peuvent être libérés dans le milieu extracellulaire par la voie des exosomes (6), ou dégradés dans les lysosomes. D'après (De Strooper and Annaert, 2010).

2.3.3 Rôle causal de l'APP dans la maladie d'Alzheimer et hypothèse de la cascade amyloïde

L'étude génétique de la trisomie 21 au regard de la maladie d'Alzheimer a fortement contribué à l'identification de l'APP comme cause génétique de la maladie d'Alzheimer. Après avoir détecté les marques de la maladie d'Alzheimer dans la trisomie 21 (Wisniewski et al., 1985), le lien entre maladie d'Alzheimer familiale et chromosome 21 a été mis en évidence (St George-Hyslop et al., 1987, Goate et al., 1989). Le peptide A β a ensuite été identifié (Glennner and Wong, 1984), puis le gène de l'APP a été cloné, localisé sur le chromosome 21 et lié au peptide

A β (Kang et al., 1987, Goldgaber et al., 1987, Tanzi et al., 1987). Dans la trisomie 21, le dosage génique de l'APP est augmenté de 50 %. L'augmentation de l'expression de l'APP joue un rôle central dans le développement de la maladie d'Alzheimer dans la population porteuse de trisomie 21 (voir section 3.2.1). Ces observations suggèrent un rôle causal de l'APP et de l'accumulation de peptide A β dans la maladie d'Alzheimer.

L'hypothèse de la cascade amyloïde a été formulée par John Hardy et Gerald Higgins en 1992 (Hardy and Higgins, 1992). Elle postule que la déposition de peptide amyloïde est la cause initiale de la maladie d'Alzheimer et que la pathologie tau, ainsi que les symptômes, en découlent (figure 14). Depuis sa forme initiale, l'hypothèse a été modifiée en fonction des découvertes récentes sur la toxicité des formes solubles d'oligomères d'A β (Lambert et al., 1998, Lesne et al., 2006, Selkoe and Hardy, 2016). Ces espèces diffusibles sont considérées plus toxiques que les plaques séniles composées d'A β insoluble. Cependant, ces résultats restent controversés, notamment à cause de la difficulté technique à détecter et à tester la toxicité de ces formes *in vivo* (Morris et al., 2014, Selkoe and Hardy, 2016).

Un certain nombre d'arguments ont été avancés en faveur et en défaveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde, et elle reste aujourd'hui très débattue. Parmi les arguments principaux en sa faveur, on retrouve :

- Les mutations identifiées dans la maladie d'Alzheimer impactent toutes le métabolisme de l'APP, la production ou la capacité d'agrégation du peptide A β .
- Le risque de développement de maladie d'Alzheimer est très élevé chez les individus porteurs de trisomie 21, chez qui le gène codant l'APP est surexprimé.
- L'allèle $\epsilon 4$ de l'APOE, facteur de risque majeur, impacte le métabolisme de l'APP et la clairance du peptide A β .

De nombreux arguments ont été avancés en défaveur de l'hypothèse de la cascade amyloïde, les principaux étant :

- Dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer, il est généralement admis que la pathologie tau apparait avant la pathologie amyloïde (Braak and Del Tredici, 2011, Kaufman et al., 2018). La pathologie tau ne serait donc pas la conséquence de l'accumulation de peptide A β . Cet argument est appuyé par certains cas cliniques rares. Par exemple, une patiente ayant reçu une greffe de dure-mère contenant de l'A β à l'âge

de 2 ans a développé une angiopathie amyloïde 40 ans plus tard, mais l'examen *post-mortem* n'a pas montré de pathologie tau dans son cerveau (Herve et al., 2018). La présence d'A β dans le tissu cérébral ne serait donc pas suffisante pour déclencher une pathologie tau (Duyckaerts et al., 2019).

- Il n'y a pas de corrélation entre les régions touchées au cours de l'évolution de la pathologie amyloïde et l'évolution des symptômes. En effet, les dépôts amyloïdes n'apparaissent que tardivement dans les régions cérébrales qui sont le siège de la mémoire, comme le cortex entorhinal et l'hippocampe, alors que la perte de mémoire est parmi les premiers symptômes. L'évolution des symptômes est plutôt corrélée avec les régions successivement touchées par la pathologie tau (Arriagada et al., 1992, Giannakopoulos et al., 2003, Hyman et al., 1993).
- On peut trouver de nombreuses plaques amyloïdes chez des individus âgés non-déments (Delaere et al., 1993, Aizenstein et al., 2008).
- Les essais cliniques visant l'A β (immunisation, inhibiteurs de β - et γ -sécrétases) n'ont pas donné de résultats probants (Ricciarelli and Fedele, 2017).

Les liens de causalité entre pathologie amyloïde, pathologie tau et maladie d'Alzheimer sont donc loin d'être consensuels. En revanche, l'accumulation anormale de peptides A β joue un rôle incontestable dans la pathologie. A cet égard, l'étude des formes familiales liées aux mutations, ainsi que l'étude de la maladie d'Alzheimer dans le contexte de la trisomie 21, sont informatifs et pertinents pour comprendre la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer.

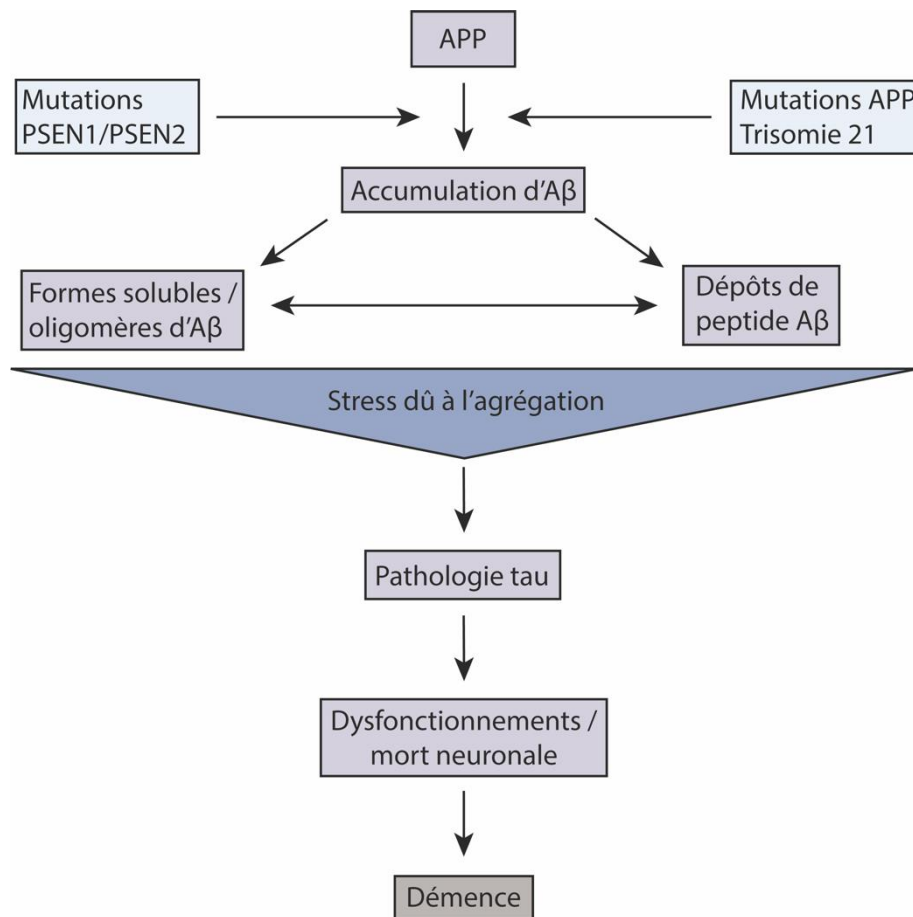


Figure 14. Hypothèse de la cascade amyloïde

Séquence des évènements proposée dans l'hypothèse de la cascade amyloïde, modifiée selon les hypothèses de toxicité des oligomères solubles d'Aβ. L'APP et l'accumulation anormale d'Aβ qui en découle engendreraient un stress, puis une pathologie tau, des dysfonctionnements neuronaux qui aboutiraient à une mort neuronale importante, et enfin une démence. Les mutations familiales et la trisomie 21 favoriseraient l'initiation de la cascade amyloïde. D'après (Karran et al., 2011).

3. Dysfonctionnements du système

endo-lysosomal dans la maladie d'Alzheimer

et la trisomie 21

3.1 Description des phénotypes

3.1.1 Endosomes précoces

La morphologie des endosomes précoces dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer a été initialement décrite par l'équipe de Ralph Nixon. En 1997, la présence d'endosomes précoces Rab5-positifs anormalement élargis a été observée dans le cortex préfrontal d'individus atteints de maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 1997). Ce phénotype a été retrouvé dans le cortex préfrontal d'individus en phase précoce asymptomatique, d'après l'examen neuropathologique des tissus (Cataldo et al., 2000) (figure 15). Cette observation a fait de l'élargissement des endosomes un des phénotypes les plus précoces de la maladie d'Alzheimer. Parallèlement à l'élargissement anormal des endosomes, les cas étudiés présentaient une augmentation du niveau de Rab5, Rabaptin-5 et de Rab4. L'allèle $\epsilon 4$ de l'APOE avait un effet néfaste sur la taille des endosomes précoces chez les individus prodromaux pour la maladie d'Alzheimer. En revanche, une fois la maladie déclarée, le génotype APOE n'influe plus sur la taille des endosomes. Dans les cas de maladie d'Alzheimer familiale, l'élargissement des endosomes dépend des mutations. Les mutations dans les gènes PSEN1 et PSEN2 ne modifient pas la taille des endosomes précoces (Cataldo et al., 2000). En revanche, les mutations London et Flemish du gène APP peuvent entraîner l'augmentation de la taille des endosomes. La taille des endosomes dans les cas de mutation Swedish étudiés dépend du génotype APOE $\epsilon 4$, et la mutation Dutch entraîne l'élargissement des endosomes dans les neurones mais pas dans les cellules endothéliales (Cataldo et al., 2001). Ces résultats sont récapitulés en table 1.

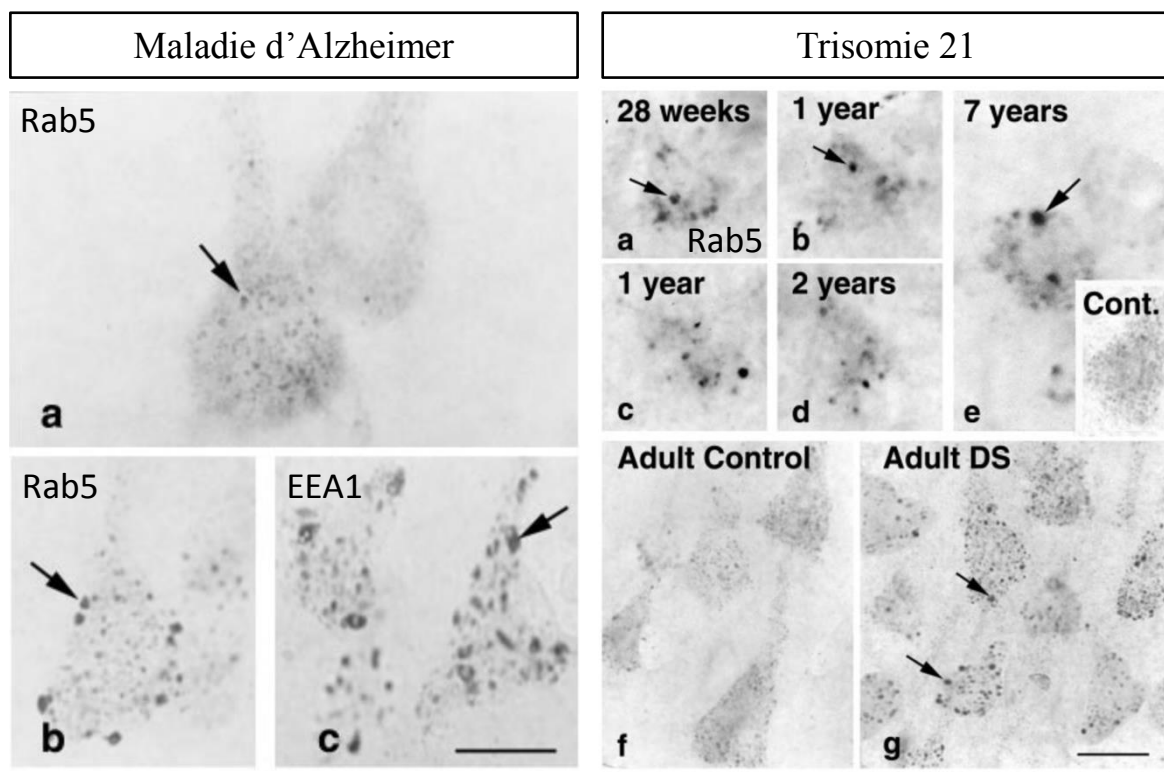


Figure 15. Endosomes précoces élargis dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21
Maladie d'Alzheimer: (a) Marquage Rab5 dans un neurone de cortex préfrontal d'un individu contrôle (b) Marquage Rab5 et (c) EEA1 dans des neurones de cortex préfrontal d'un individu non-symptomatique pré-Alzheimer, montrant un élargissement des endosomes précoces.
Trisomie 21: (a-e) Marquage Rab5 dans des neurones de cortex préfrontal d'individus porteurs de trisomie 21 à divers âges, dont un fœtus de 28 semaines. Neurone d'un individu contrôle encadré. (g) Le phénotype est retrouvé chez l'adulte, par rapport aux individus contrôles (f). Barre d'échelle (a-g) = 20 µm. D'après (Cataldo et al., 2000).

Mutations	Neurones	Cellules endothéliales
APP Swedish /APOE4	✓	✓
APP London	✓	✓
APP Dutch	✓	×
APP Flemish	✓	✓
PSEN1	×	×
PSEN2	×	×

Table 1. Endosomes élargis dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer

Observations du phénotype d'élargissement des endosomes précoces Rab5-positifs dans différentes mutations liées à des formes familiales de la maladie d'Alzheimer, dans des neurones pyramidaux du cortex frontal et cellules endothéliales cérébrales.

L'élargissement des endosomes précoces n'a été retrouvé dans aucune autre maladie neurodégénérative, telles que l'encéphalite, la maladie de Pick, la maladie de Huntington, la démence à corps de Lewy, la paralysie supranucléaire progressive et la sclérose latérale amyotrophique (Cataldo et al., 2000).

Il a été démontré que les endosomes élargis sont présents dans le néocortex d'individus porteurs de trisomie 21, dès le stade embryonnaire (28 semaines de gestation). Le nombre de neurones contenant des endosomes précoces élargis augmente chez l'enfant et atteint un plateau au début de l'âge adulte (~ 40 % des neurones) (Cataldo et al., 2000).

Dans la trisomie 21 (hors cas de mosaïque), toutes les cellules portent 3 copies du chromosome 21. On peut donc s'attendre à retrouver le phénotype d'endosomes précoces élargis dans les cellules périphériques. En effet, des anomalies endosomales ont été observées dans des fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21. Un élargissement des endosomes Rab5-, EEA1- et Rab7-positifs a été détecté, ainsi qu'un niveau augmenté de Rab5, Rab4 et Rab7. Les endosomes Rab4-positifs sont plus nombreux dans les fibroblastes trisomiques que dans les fibroblastes contrôles. Dans ces cellules, une augmentation de l'internalisation de HRP, de transferrine et d'EGF suggère une augmentation de l'endocytose récepteur-dépendante et de l'endocytose de phase fluide (Cataldo et al., 2008).

Notre équipe a identifié une augmentation de la taille des endosomes précoces EEA1- et Rab5-positifs dans des cellules mononucléaires sanguines périphériques, des lignées de cellules lymphoblastoïdes et des fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21, confirmant la présence du phénotype « endosomes élargis » dans différents types cellulaires périphériques dans la trisomie 21 (Cossec et al., 2012).

Dans la maladie d'Alzheimer, l'équipe a précédemment identifié la présence d'endosomes EEA1-positifs élargis dans des cellules mononucléaires sanguines périphériques et des fibroblastes provenant d'individus atteints de troubles cognitifs légers ou de maladie d'Alzheimer (Corlier et al., 2015, Cossec et al., 2012). Cependant, ces modifications sont moins importantes dans la maladie d'Alzheimer que dans la trisomie 21, par rapport aux cellules contrôles (table 2).

Type cellulaire	Trisomie 21	Maladie d'Alzheimer sporadique
Cellules mononucléaires sanguines périphériques	31 %	9%
Lignées de cellules lymphoblastoïdes	22 %	-
Fibroblastes	30 %	16 %

Table 2. Proportion d'élargissement des endosomes précoces

Pourcentage d'augmentation du volume moyen des endosomes précoces dans différents types cellulaires, dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer sporadique par rapport aux cellules contrôles.

Dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer, des phénotypes similaires ont été observés. Les endosomes Rab5-positifs ont une surface moyenne augmentée de 2,42 fois dans les neurones de souris surexprimant l'APP (Swedish) par rapport aux souris wild-type (WT). Dans les souris qui surexpriment l'APP (London), l'augmentation de la surface des endosomes n'est pas significative (x1,42) (Choi et al., 2013).

Dans les neurones de la souris Ts65Dn, modèle de trisomie 21, des endosomes Rab5-positifs élargis ont été observés dans les neurones cholinergiques du septum mais leur taille n'a pas été quantifiée (Cataldo et al., 2003). Dans les neurones de l'hippocampe, leur taille a été quantifiée mais elle n'est pas modifiée (Salehi et al., 2006).

3.1.2 Endosomes tardifs & lysosomes

De nombreuses anomalies ont été identifiées dans les endosomes tardifs et les lysosomes dans la maladie d'Alzheimer (Colacurcio et al., 2018). Les niveaux de Rab7 (Ginsberg et al., 2010a), du LBPA (lipide associé aux MVB) (Chan et al., 2012) et de la cathepsine-D (Cataldo et al., 1995) sont augmentés. Par ailleurs, la cathepsine-D est associée aux plaques amyloïdes dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 1996). Un défaut d'acidification du pH lysosomal dû au dysfonctionnement de la préséniline-1 et de la V-ATPase a été observé dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer et dans des modèles murins de maladie d'Alzheimer (Avrahami et al., 2013, Coffey et al., 2014, Lee et al., 2010, Lee et al., 2015). Les produits de clivage de l'APP s'accumulent anormalement dans les lysosomes de neurones de patients Alzheimer et de souris modèles de la maladie (Langui et al.,

2004, Lauritzen et al., 2012, Lauritzen et al., 2016, Torres et al., 2012). Récemment, il a été montré que des mutations dans les gènes APP et PSEN1 perturbent le fonctionnement de l'autophagie et des lysosomes dans des neurones humains dérivés de cellules souches pluripotentes induites (induced pluripotent stem cells, iPSC) (Hung and Livesey, 2018). Ces dysfonctionnements sont abolis par l'abaissement du niveau d'APP- β CTF. Cet article évalue l'effet de mutations sur les endosomes précoces en surexprimant Rab5-GFP, afin de suivre les endosomes en microscopie live. Cependant, la surexpression d'un régulateur de la voie endosomale tel que Rab5 a des conséquences importantes sur l'homéostasie des organelles. La surexpression de Rab5 augmente la fusion entre endosomes, gênant l'observation de modifications morphologiques et biochimiques. Malgré tout, la littérature a montré une interaction néfaste entre APP et lysosomes mais les liens de causalité ne sont pas clairs. Cette étude montre que l'APP peut être causal dans le dysfonctionnement lysosomal observé dans les formes familiales de maladie d'Alzheimer (Hung and Livesey, 2018).

Les anomalies de maturation des endosomes et des lysosomes ont été très étudiées dans la maladie d'Alzheimer, mais peu d'études ont été menées dans la trisomie 21. Une augmentation de la taille et du nombre d'endosomes tardifs Rab7- et LBPA-positifs a été observée dans des fibroblastes et des neurones du cortex frontal d'individus porteurs de trisomie 21 (Cataldo et al., 2008). L'augmentation du niveau de Rab7 observée dans les fibroblastes trisomiques a été associée à l'augmentation de l'endocytose (Cataldo et al., 2008). La cathepsine-D est relocalisée dans des compartiments plus précoces de la voie endosomale dans ces fibroblastes, et l'activité et le niveau de l'enzyme sont augmentés (Cataldo et al., 2008). Comme dans la maladie d'Alzheimer, la cathepsine-D est enrichie au niveau des dépôts amyloïdes dans le cerveau d'individus porteurs de trisomie 21 (Cataldo et al., 1996). De plus, l'oxydation de la cathepsine-D et de la V-ATPase est augmentée dans le cerveau d'individus porteurs de trisomie 21 (Di Domenico et al., 2013).

L'adressage membranaire des MVB entraîne la libération d'exosomes dans le milieu extracellulaire. Dans la trisomie 21, la sécrétion d'exosomes est augmentée dans le cerveau d'individus porteurs de trisomie 21 (Gauthier et al., 2017). Ce phénotype semble protecteur contre l'augmentation anormale de la taille des endosomes précoces. Les exosomes produits par les neurones et purifiés depuis le sang d'individus porteurs de trisomie 21 sont enrichis en A β ₄₂ and tau hyperphosphorylée (Hamlett et al., 2017).

3.1.3 Rétromère

La première anomalie du rétromère identifiée dans la maladie d'Alzheimer était une diminution du niveau de Vps35 et Vps26 dans le cortex entorhinal de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Small et al., 2005). Un polymorphisme dans le gène SORL1, codant un membre de la machinerie du rétromère, est impliqué dans la maladie d'Alzheimer (Dodson et al., 2006, Kimura et al., 2009, Lambert et al., 2013, Rogaeva et al., 2007). Des variants dans les gènes codant d'autres membres du rétromère (SNX1, SNX3, Rab7) ont été identifiés dans la maladie d'Alzheimer (Vardarajan et al., 2012). La dérégulation du complexe du rétromère semble donc associée aux dérégulations cellulaires dans la maladie d'Alzheimer, certainement en modifiant le trafic intracellulaire de l'APP. En effet, il est connu que l'APP fait partie des cargos pris en charge et triés par le complexe du rétromère (Vieira et al., 2010). Il est supposé qu'un défaut dans le tri permettant à l'APP de quitter l'endosome précoce induit une augmentation du temps de contact entre l'APP et les sécrétases, et donc l'augmentation de la production de peptide A β (Small and Petsko, 2015). Enfin, le niveau du PI(3)P est diminué dans la maladie d'Alzheimer (Morel et al., 2013). Cette baisse pourrait impacter négativement le recrutement de SNX à la membrane endosomale et perturber le tri de cargo rétromère-dépendent.

Dans la trisomie 21, le défaut principal identifié en rapport avec le rétromère concerne la dérégulation de SNX27. SNX27 est associé au recyclage des cargos vers la membrane plasmique (Temkin et al., 2011). Une étude a montré que le niveau de SNX27 est anormalement diminué dans le cerveau d'individus porteurs de trisomie 21 (Wang et al., 2013). Cette anomalie est due à l'augmentation du miRNA-155 codé par un gène du chromosome 21, qui régule négativement un facteur de transcription de SNX27 (Wang et al., 2013). Les souris SNX27^{+/-} présentent un défaut d'apprentissage et de mémorisation, ainsi qu'un dysfonctionnement synaptique. Ces phénotypes comportementaux sont également observés dans la souris Ts65Dn, modèle de la trisomie 21, et sont abolis par l'augmentation de SNX27 par injection dans l'hippocampe de ces souris (Wang et al., 2013). En condition physiologique, SNX27 empêche la production de peptide A β car il se lie à la préséniline-1 et favorise la dissociation du complexe γ -sécrétase (Wang et al., 2014).

3.1.4 Défaut du système endo-lysosomal : conséquences sur le trafic neuronal

Les neurones cholinergiques du prosencéphale basal (basal forebrain cholinergic neurons, BFCN) sont particulièrement susceptibles à la dégénérescence dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21, ce qui entraîne des troubles cognitifs associés à la maladie d'Alzheimer. Il a été démontré que la dégénérescence du système cholinergique septohippocampal induit des défauts de mémoire chez le rat (Browne et al., 2001), et l'étude de cerveau *post-mortem* de patients atteints de maladie d'Alzheimer montre une corrélation entre dégénérescence du système cholinergique et trouble cognitif (Baskin et al., 1999). Le processus de dégénérescence commence dès les stades précoces de la maladie d'Alzheimer (Geula et al., 2008) et serait causé par l'accumulation de peptide A β ₄₂ dans ces neurones (Baker-Nigh et al., 2015). La dégénérescence des BFCN est également observée dans des modèles murins de trisomie 21 (Ts65Dn, Ts2) et de maladie d'Alzheimer familial due à des mutations du gène de l'APP (APP Swedish et APP London) (Granholm et al., 2000, Holtzman et al., 1996, Jiang et al., 2016, Choi et al., 2013). Ce réseau neuronal a été particulièrement étudié dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21.

De nombreuses études ont montré l'existence d'un lien entre modification du système endo-lysosomal et trafic des neurotrophines dans les neurones en condition trisomique. Dans la trisomie 21, les souris modèles Ts65Dn et Ts1Cje présentent une anomalie du trafic du NGF (neural growth factor) dans les BFCN, ainsi qu'une dégénérescence des BFCN liée à l'augmentation de l'expression de l'APP (Cooper et al., 2001, Salehi et al., 2006, Xu et al., 2016). Dans la souris Ts65Dn, le NGF est un cargo détecté dans les endosomes anormalement élargis, suggérant que l'élargissement des endosomes pourrait induire la dégénérescence des neurones cholinergiques (Salehi et al., 2006). Plus récemment, il a été montré qu'une activation APP-dépendante de Rab5 peut perturber le trafic du NGF, et que cette anomalie est abolie par la surexpression de Rab5-inactif (lié au GDP) (Xu et al., 2016). Les mutations dans les gènes APP et PSEN1 ont été récemment liées à une diminution du mouvement et à l'augmentation de la taille des lysosomes dans les axones de neurones humains dérivés d'iPSC (Hung and Livesey, 2018). Ces études montrent que le trafic de neurotrophine est altéré dans la trisomie 21 et les formes familiales de maladie d'Alzheimer, et que l'APP est impliqué dans ces anomalies (Chen et al., 2018).

3.2 Gènes et mécanismes impliqués dans les dysfonctionnements endosomaux dans la trisomie 21

3.2.1 APP

Les dysfonctionnements du système endo-lysosomal sont liées à l'APP et ses produits de clivage dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21. Dans les deux pathologies, les endosomes précoces élargis sont enrichis en peptide A β (Cataldo et al., 2004). L'élargissement des endosomes précoces est observé dans les cas de mutations du gène APP mais pas dans les gènes PSEN1 et PSEN2 (Cataldo et al., 2000, Cataldo et al., 2001). C'est pourquoi il a été suggéré que l'APP joue un rôle central dans ce contexte.

Différentes études ont montré que l'APP est responsable de l'élargissement des endosomes précoces dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21. L'élargissement des endosomes précoces a été identifié dans les BFCN (tissu et culture primaire) de souris Ts65Dn (Cataldo et al., 2003, Xu et al., 2016). L'observation du phénotype dans les souris APP (Swedish) a donné des résultats contradictoires (Cataldo et al., 2003, Choi et al., 2013). Ce phénotype est absent dans les souris Ts1Cje, qui modélisent la trisomie 21 mais n'ont pas de triplication de la région chromosomique portant le gène de l'APP (Cataldo et al., 2003). La suppression d'une copie de l'APP dans la souris Ts65Dn (Ts65Dn App +/-) abolit l'élargissement des endosomes précoces (Cataldo et al., 2003). Dans la souris Ts2 qui porte les mêmes gènes tripliqués que la souris Ts65Dn, l'élargissement des endosomes précoces a également été observé mais non quantifié (Jiang et al., 2016). Dans ce modèle, la réduction partielle de BACE1 (Ts2.BACE1 +/-) restaure la taille des endosomes précoces et le nombre de BFCN (Jiang et al., 2016). La réduction de BACE1 dans ce modèle diminue le niveau d'APP- β CTF mais pas de peptide A β .

La surexpression d'APP induit donc l'augmentation de la taille des endosomes précoces, comme le montrent les expériences de transfection de l'APP ou de l'APP- β CTF dans des cellules en culture (fibroblastes, PC12, N2a) (Jiang et al., 2010, Kim et al., 2016, Xu et al., 2016). Dans des fibroblastes, la modulation du niveau d'APP- β CTF par inhibition de la γ -sécrétase, surexpression de l'APP- β CTF ou diminution de BACE1 montre que ce produit de clivage de l'APP, le β CTF, est plus spécifiquement impliqué dans l'élargissement des endosomes précoces (Jiang et al., 2010). Le lien moléculaire entre APP et taille des endosomes

a ensuite été recherché. Un lien entre surexpression de Rab5 et augmentation d'APP- β CTF avait été initialement identifié (Grbovic et al., 2003). Plus récemment, le groupe de Ralph Nixon a montré que dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21, l'APP- β CTF recrute APPL1 aux endosomes précoces, stabilisant la forme active de Rab5. La suractivation de Rab5 entraînerait alors une augmentation de la fusion des endosomes précoces, expliquant le phénotype d'élargissement des endosomes observé dans les deux pathologies (Kim et al., 2016) (figure 16). Une autre étude a montré que la surexpression de l'APP^{M596V} (mutation empêchant le clivage β et la production de β CTF) entraîne également une activation de Rab5 et un élargissement des endosomes précoces (Xu et al., 2016), ce qui n'était pas le cas dans l'étude précédente (Kim et al., 2016). Ce résultat suggère que l'activation de Rab5 peut également être indépendante du β CTF.

Comme mentionné dans la première partie, les endosomes APPL1-positifs forment une population distincte des endosomes EEA1-positifs. Il reste à déterminer si le mécanisme proposé dans ces études s'applique à toutes les populations d'endosomes précoces dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer. Par ailleurs, une étude a montré que l'inhibition du complexe γ -sécrétase, diminuant la production de peptide A β et augmentant le niveau d'APP- β CTF, restaure les anomalies comportementales cognitives chez la souris Ts65Dn (Netzer et al., 2010). Le rôle de l'APP- β CTF dans l'apparition des troubles cognitifs liés à la maladie d'Alzheimer reste donc sujet à caution.

Le dosage génique de l'APP est impliqué dans le développement de la maladie d'Alzheimer chez les individus porteurs de trisomie 21. Il a été montré que la duplication de l'APP chez des individus par ailleurs euploïdes est à l'origine du développement de la maladie d'Alzheimer chez ces individus (Rovelet-Lecrux et al., 2006, Sleegers et al., 2006). A l'inverse, les trisomies partielles excluant le gène de l'APP sont informatives à ce sujet. Les cas d'individus porteurs de trisomie 21 partielle excluant le gène de l'APP morts à l'âge de 72 ans et 78 ans ont été rapportés (Doran et al., 2017, Prasher et al., 1998). Malgré leur âge avancé, ces individus ne présentaient aucun signe de démence de type Alzheimer et très peu de marques neuropathologiques de la maladie d'Alzheimer, équivalent à ce que l'on peut observer lors du vieillissement normal d'une personne euploïde. Cependant, des résultats contradictoires ont été obtenus dans des modèles cellulaires de duplication de l'APP. Un élargissement anormal des endosomes précoces a été décrit dans des neurones dérivés d'iPSC mais pas dans des lignées de cellules lymphoblastoïdes provenant d'individus porteurs de duplication de l'APP (Israel et

al., 2012, Cossec et al., 2012). Plusieurs études suggèrent que d'autres gènes du chromosome 21 participeraient aux dysfonctionnements endosomaux et au développement de la maladie d'Alzheimer. Il a été montré récemment que des souris portant un chromosome 21 humain excluant le gène de l'APP croisées avec des souris transgéniques APP (Swedish+London) accumulent plus de dépôts amyloïdes et présentent plus de troubles cognitifs que les souris transgéniques APP (Swedish+London) seules. Cette étude montre que l'augmentation du dosage génique d'autres gènes du chromosome 21 en dehors de l'APP entraîne ces anomalies par une augmentation du ratio $A\beta_{40}/A\beta_{42}$, indépendamment de l'accumulation d'APP- β CTF et de l'activité des sécrétases (Wiseman et al., 2018). L'ensemble de ces résultats suggère que la surexpression d'autres gènes du chromosome 21 s'associe avec l'APP dans l'apparition d'anomalies cellulaires et cognitives dans la trisomie 21.

Le rôle de l'APP dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer a orienté la recherche sur les anomalies endosomales dans la trisomie 21 dans cette direction. L'étude de corrélations phénotype-génotype a permis d'identifier une région du chromosome 21 particulièrement responsable des phénotypes de la trisomie 21, appelée DSCR (Down Syndrome Critical Region) (Delabar et al., 1993). Le gène de l'APP est situé dans cette région. Cependant, de nombreux gènes du chromosome 21 participent directement ou indirectement aux phénotypes observés dans la trisomie 21, et méritent un intérêt particulier pour comprendre les mécanismes des dysfonctionnements endosomaux dans la trisomie 21. Au moins deux protéines dont le gène est codé sur le chromosome 21 sont directement impliquées dans la régulation de la voie endosomale : l'intersectine-1 (ITSN1) et la synaptojanine-1 (SYNJ1). Ils font l'objet des sections suivantes.

3.2.2 Intersectine-1 (ITSN1)

Le gène de l'ITSN1, localisé dans la DSCR, code une isoforme courte et une isoforme longue de l'ITSN1. Les deux isoformes ont une structure en domaines modulaires : deux domaines EH (Eps15 Homology), un domaine CC (Coiled-Coil) et 5 domaines SH3 (Src Homology 3). L'isoforme longue a en plus un domaine DH (Dbl Homology), un domaine PH (Pleckstrin Homology) et un domaine C2. Ces domaines assurent la fonction de protéine d'échafaudage de l'ITSN1 en liant de nombreux partenaires moléculaires (figure 16). L'interaction de l'ITSN1 avec la dynamine via le domaine SH3 en fait un membre des machineries de l'endocytose

clathrine-dépendante et cavéoline-dépendante (Okamoto et al., 1999, Predescu et al., 2003). L'ITSN1 interagit avec des membres majeurs de l'endocytose clathrine-dépendante, comme l'AP2 (Pechstein et al., 2010) ou la synaptojanine-1 (Tong et al., 2000). L'ITSN1 contrôle également la polymérisation du cytosquelette d'actine en se liant à Cdc42, activant N-WASP et Arp2/3 (Hussain et al., 2001, McGavin et al., 2001). Ces protéines sont des régulateurs importants de la formation des vésicules d'endocytose (Benesch et al., 2005, Merrifield et al., 2004), des mouvements endosomaux actine-dépendants (Benesch et al., 2002, Rozelle et al., 2000, Taunton et al., 2000), et de la morphologie des endosomes (Duleh and Welch, 2010). Les fonctions de l'ITSN1 la lient directement à l'homéostasie endosomale. De plus, l'ITSN1 est impliquée dans des voies de signalisation en interagissant avec des membres de la famille des Ras-GTPase et des récepteurs tyrosine kinase (Hunter et al., 2013). Des expériences de modulation du niveau de l'ITSN1 montrent son implication dans l'endocytose. Augmenter ou diminuer le niveau d'ITSN1 aboutit dans les deux cas à l'inhibition de l'endocytose de récepteurs. Toute modification au niveau de l'ITSN est donc délétère pour l'endocytose (Martin et al., 2006, Thomas et al., 2009, Yu et al., 2008).

L'expression de l'ITSN1 est augmentée dans le cerveau d'individus porteurs de trisomie 21 (Hunter et al., 2011, Pucharcos et al., 1999). Les transcrits ITSN1 sont aussi augmentés dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer (Dunckley et al., 2006, Wilmot et al., 2008). Malgré ces anomalies, l'implication de l'ITSN1 dans les dysfonctionnements endosomaux n'a pas été étudiée dans ces pathologies.

3.2.3 Synaptojanine-1 (SYNJ1)

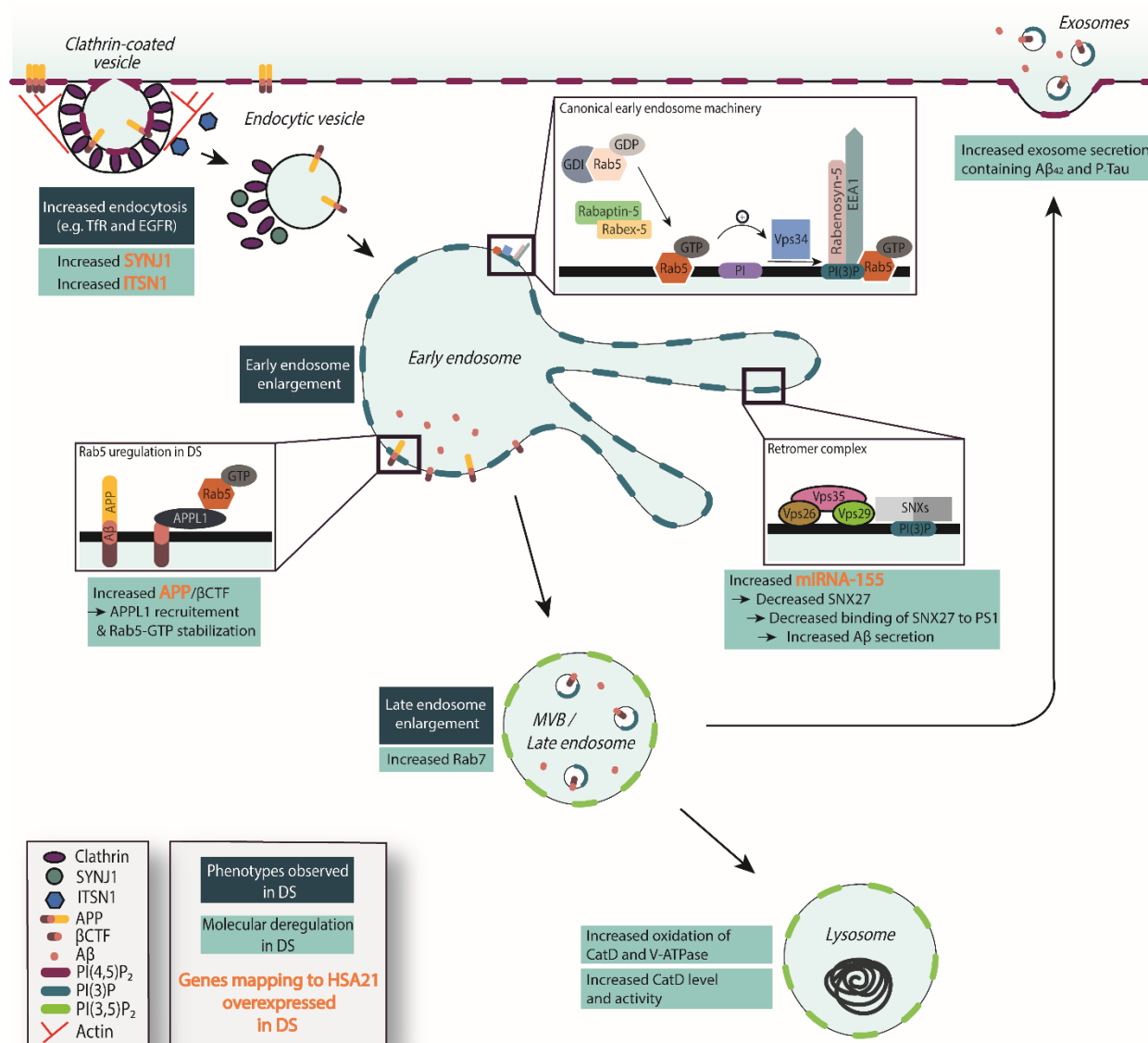
Le gène *SYNJ1* code pour deux isoformes de la protéine : SYNJ1-145kDa qui est exprimée dans le cerveau et SYNJ1-170kDa qui est exprimée ubiquitairement (Ramjaun and McPherson, 1996). Les deux isoformes sont constituées d'un domaine SAC1 en N-terminal, d'un domaine 5-phosphatase central, et d'un domaine riche en proline en C-terminal (McPherson et al., 1996). L'isoforme SYNJ1-145kDa a été la plus étudiée dans le cadre de l'endocytose, c'est l'isoforme décrite ci-dessous. SYNJ1 est principalement définie par son domaine 5-phosphatase, qui déphosphoryle $PI(4,5)P_2$ en $PI(4)P$. Cependant, son domaine SAC1 peut déphosphoryler $PI(3)P$, $PI(4)P$ et $PI(3,5)P_2$, participant ainsi à l'activité catalytique de la protéine (Guo et al., 1999, Mani et al., 2007). Le $PI(4,5)P_2$ est impliqué dans la plupart des événements ayant lieu à la membrane plasmique où il est localisé, et il est particulièrement impliqué dans l'endocytose

clathrine-dépendante. En effet, il se lie à toutes les protéines adaptatrices de la clathrine, ainsi qu'à d'autres membres de la machinerie de l'endocytose tel que l'ITSN1 (Di Paolo and De Camilli, 2006, Schink et al., 2016). De plus, le PI(4,5)P₂ est impliqué dans le recrutement de la dynamine et assure la conversion PI(4,5)P₂-PI(4)P lors de l'*uncoating* (Jost et al., 1998) (figure 16).

La surexpression de SYNJ1 entraîne l'élargissement des endosomes précoces dans des cellules de type neuroblastome (Cossec et al., 2012). De plus, la diminution du niveau de SYNJ1 dans des fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21 restaure la taille des endosomes, montrant que la surexpression de SYNJ1 participe aux dysfonctionnements des endosomes dans la trisomie 21 (Cossec et al., 2012). Les souris transgéniques SYNJ1 ont également des endosomes élargis (Cossec et al., 2012). Ces souris présentent des défauts de mémoire spatiale (Voronov et al., 2008), une hyperexcitabilité des neurones de l'hippocampe et une instabilité des champs de lieu (Miranda et al., 2018). Dans le tissu cérébral d'individus porteurs de trisomie 21 atteints de maladie d'Alzheimer, le niveau de SYNJ1 est corrélé négativement au niveau de synaptophysine, marqueur de l'intégrité synaptique. Aucune corrélation n'a été identifiée chez les individus porteurs de trisomie 21 plus jeunes, suggérant que SYNJ1 est associé au développement de la maladie d'Alzheimer dans la trisomie 21 (Miranda et al., 2018). En plus de l'augmentation de SYNJ1 dans la trisomie 21, le niveau de SYNJ1 est encore augmenté chez les individus trisomiques atteints de maladie d'Alzheimer. En outre, l'activité de SYNJ1 est augmentée par DYRK1A, un autre gène situé sur le chromosome 21 (Chen et al., 2014b).

Dans la maladie d'Alzheimer, différentes anomalies liées à SYNJ1 et à l'homéostasie du PI(4,5)P₂ ont été identifiées. Le peptide Aβ diminue le niveau de PI(4,5)P₂ *in vitro*, et l'inhibition de la LTP Aβ-dépendante est restaurée dans les souris SYNJ1^{+/-} (Berman et al., 2008). Diminuer SYNJ1 permet également de restaurer les déficits d'apprentissage et de mémorisation dans des modèles de maladie d'Alzheimer familiale (McIntire et al., 2012, Zhu et al., 2013). Le polymorphisme du gène codant SYNJ1 a été récemment associé aux déficits de mémoire et à l'âge de début de la maladie dans les cas de maladie d'Alzheimer familiale (Miranda et al., 2018). L'expression de SYNJ1 est augmentée dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer qui ont un génotype APOE ε4. La diminution du niveau de SYNJ1 dans des souris APOE-KI (Knock-In) permet de restaurer le niveau de PI(4,5)P₂, ainsi que les performances cognitives de ces souris (Zhu et al., 2015). Dans le cerveau de patients

atteints de maladie d'Alzheimer, les dégénérescences neurofibrillaires sont enrichies en PI(4,5)P₂ (Nishikawa et al., 2014). Cet ensemble d'étude indique que SYNJ1 est impliqué dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, aussi bien chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer sporadique, familiale, ou due à la trisomie 21. Cependant, les mécanismes à l'origine de ces anomalies restent à identifier.



Récemment, la mutation R258Q a été impliquée dans une anomalie de biogénèse des autophagosomes, certainement à cause d'une dérégulation de PI(3)P et PI(3,5)P₂ (Vanhauwaert et al., 2017). Les mutations du domaine SAC1 mettent en lumière les différents niveaux de régulation de l'homéostasie des phosphoinositides par SYNJ1. Ces observations soulèvent l'hypothèse d'une dérégulation des phosphoinositides endosomaux dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21, jusqu'ici peu étudiés.

3.2.4 Phosphoinositides

Il apparaît de plus en plus que la dérégulation du métabolisme des phosphoinositides est associée aux maladies neurologiques et neurodégénératives. S'ils représentent une faible proportion des phospholipides, les phosphoinositides sont des régulateurs cruciaux du trafic vésiculaire, des voies de signalisation et des canaux ioniques. Sept types de phosphoinositides, dérivés du phosphatidylinositol (PI), composent cette famille de lipides : PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃. Ils sont produits par une variété de kinases et phosphatases, qui régulent finement leurs concentrations (figure 17). Les phosphoinositides sont localisés sur les membranes de compartiments cellulaires, où ils interagissent avec un grand nombre d'effecteurs. Certains phosphoinositides sont spécifiquement associés aux membranes des compartiments endosomaux. Comme décrit ci-dessus, le premier phosphoinositide intervenant dans la voie endosomale est le PI(4,5)P₂. La déphosphorylation du PI(4,5)P₂ et du PI(4)P par les 4- et 5-phosphatases, dont SYNJ1, intervient lors du transport des vésicules d'endocytose vers les endosomes précoces. Les endosomes précoces sont enrichis en PI(3)P. La majorité du PI(3)P endosomal est produit à partir du PI par le complexe Vps34, après activation de Rab5. Dans la voie de dégradation, le PI(3)P peut être déphosphorylé en PI, phosphorylé en PI(3,5)P₂ par PIKfyve, ou être internalisé avec les ILV (Stenmark and Gillooly, 2001).

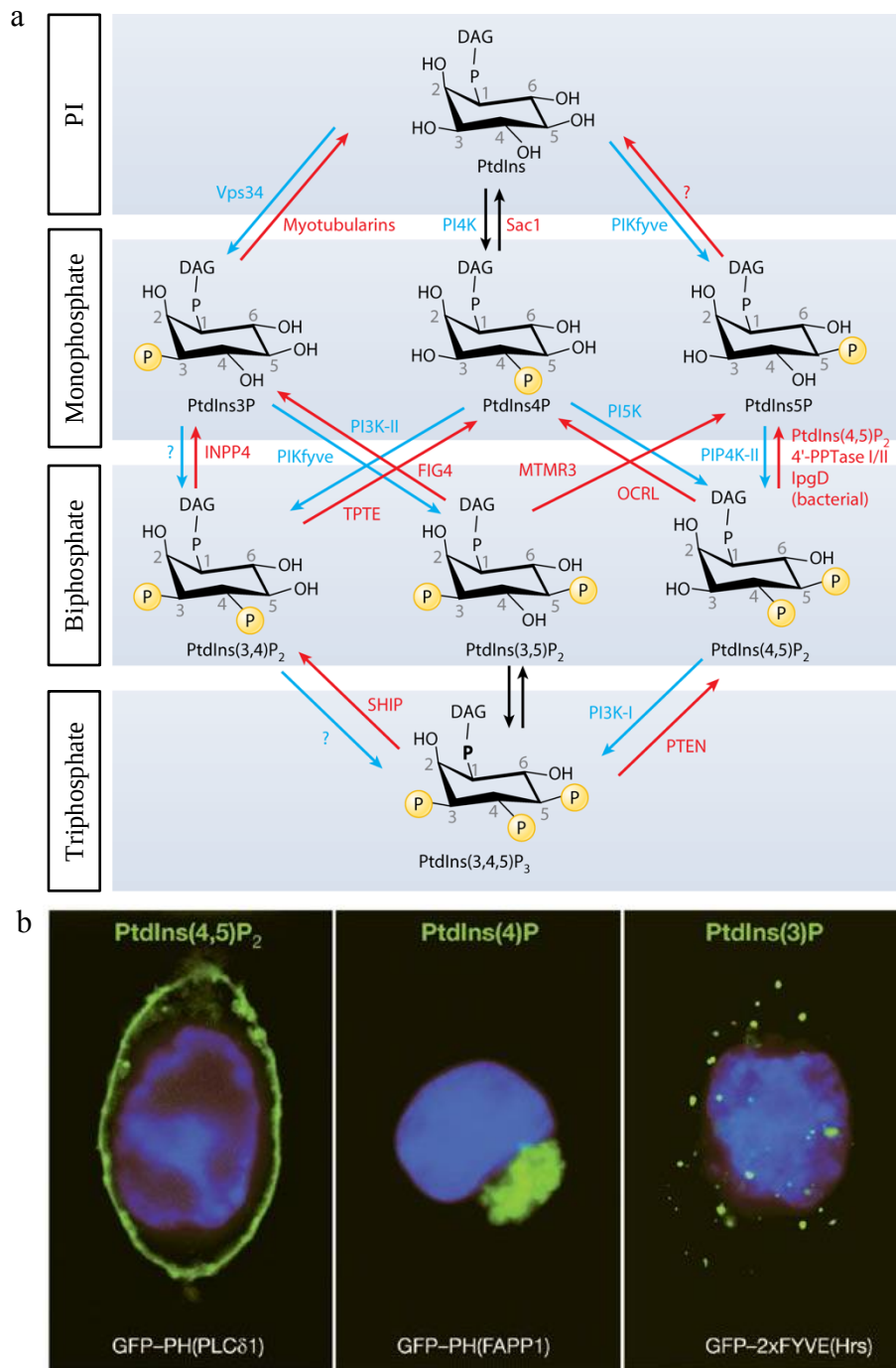


Figure 17. Métabolisme et localisation des phosphoinositides

(a) PI et les sept phosphoinositides, avec les différentes kinases (bleu) et phosphatases (rouge) qui les produisent. D'après (Schink et al., 2016). (b) Exemples de localisation cellulaire du PI(4,5)P₂ (membrane plasmique), du PI(4)P (appareil de Golgi) et du PI(3)P (endosomes), observés avec des sondes transfectées composées de domaines provenant de protéines liant spécifiquement ces phosphoinositides, fusionnés à la GFP. D'après (Di Paolo and De Camilli, 2006).

De nombreuses dérégulations du métabolisme des phosphoinositides ont été identifiées dans la maladie d'Alzheimer. A la recherche de biomarqueurs sanguins des phases asymptomatiques de la maladie d'Alzheimer, une étude a identifié 10 lipides permettant de prédire une conversion vers la maladie d'Alzheimer dans les 2-3 ans avec une précision de 90 %, parmi lesquels figure le PI (Mapstone et al., 2014). Dans la famille des phosphoinositides, le PI(3)P, PI(4)P, PI(4,5)P₂ et PI(3,4,5)P₃ ont été associés à la maladie d'Alzheimer. Parmi ces phosphoinositides, PI(4,5)P₂ et PI(3)P régulent l'endocytose et le trafic endosomal. Le niveau de PI(3)P est significativement diminué dans le cerveau de patients atteint de maladie d'Alzheimer et dans des souris modèles de la maladie d'Alzheimer familiale (APP (Swedish), PSEN1 (M146V) et APP/PSEN1 double-transgéniques) (Morel et al., 2013). En outre, cette étude montre que le PI(3)P est nécessaire au tri de l'APP vers les ILV, et que la diminution de l'adressage de l'APP vers les MVB augmente la production de peptide Aβ. Dans la trisomie 21, la seule anomalie de phosphoinositides connue à ce jour concerne le PI(4,5)P₂, comme décrit ci-dessus. D'autres phosphoinositides de la voie endosomale pourraient être dérégulés dans la trisomie 21, par effet direct ou indirect de gènes du chromosome 21. Par exemple, il a été montré récemment que l'APP peut se lier et moduler l'activité de PIKfyve (Balklava et al., 2015, Currinn et al., 2016, Currinn and Wassmer, 2016), une kinase qui joue un rôle majeur dans la maturation des endosomes (Jefferies et al., 2008, de Lartigue et al., 2009). L'ensemble de ces données suggère que le métabolisme des phosphoinositides de la voie endosomale est modifié dans la maladie d'Alzheimer et la trisomie 21, mais aucune étude n'a encore testé l'implication de ces anomalies sur les phénotypes endosomaux anormaux connus dans les deux pathologies.

4. Hypothèses de travail et objectifs

De nombreuses études ont mis en évidence des défauts de la voie endo-lysosomale dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer. Parmi ces anomalies, l'élargissement des endosomes précoces est observé dans de nombreux modèles de trisomie 21 et de maladie d'Alzheimer et apparaîtrait avant les deux pathologies amyloïde et tau. L'hypothèse communément acceptée pour expliquer l'élargissement des endosomes est une augmentation de la fusion membranaire des endosomes (Grbovic et al., 2003, Kim et al., 2016). Des endosomes précoces « géants » ont été observés dans des cellules sur-exprimant la GTPase Rab5 (Wegner et al., 2010). D'autre part une augmentation de Rab5-GTP a été trouvée dans des modèles de trisomie 21 et de maladie d'Alzheimer, suggérant ainsi que cette augmentation serait responsable d'une fusion endosomale anormalement élevée aboutissant à la formation d'endosomes précoces élargis (Jiang et al., 2010, Grbovic et al., 2003, Kim et al., 2016, Xu et al., 2016). La surexpression d'APP, entraînant une augmentation de β -CTF, est suspectée d'être responsable du recrutement d'APPL1 qui stabiliserait la forme de Rab5 liée au GTP et promouvrait ainsi la fusion des endosomes précoces (Kim et al., 2016).

En dehors de l'APP, notre équipe a montré que la surexpression du gène du chromosome 21 *SYNJ1* serait également impliquée dans l'élargissement des endosomes précoces (Cossec et al., 2012). D'autre part, le cholestérol anormalement augmenté dans le cerveau de patients atteints de maladie d'Alzheimer entraînerait ce phénotype (Marquer et al., 2014). L'implication de l'APP dans l'élargissement des endosomes précoces est remise en question par nos observations sur des cas familiaux de maladies d'Alzheimer portant des microduplications du gène *APP*. En effet, des lymphoblastoïdes provenant d'individus porteurs de microduplications *APP* ne présentent pas d'anomalies endosomales (Cossec et al., 2012). Ce résultat est confirmé par une étude menée sur du tissu cérébral provenant des patients porteurs de microduplications *APP* (manuscrit en préparation). Il semblerait donc que la surexpression d'APP ne soit pas seule responsable des anomalies endosomales.

Les études publiées à ce jour concernant la quantification de la taille des endosomes précoces dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer sont basées sur des observations par microscopie optique classique. Nous avons émis l'hypothèse que la morphologie des endosomes précoces puisse être différente s'ils étaient observés à haute résolution. D'autre part, la caractérisation morphologique des endosomes à haute résolution devrait permettre de mieux comprendre les mécanismes pathologiques.

La première partie du travail de thèse porte sur la **caractérisation morphologique des endosomes précoces dans différents modèles de la trisomie 21 à l'aide de techniques de microscopies avancées**. Pour cela, nous avons étudié des lignées de cellules lymphoblastoïdes, des fibroblastes, des cerveaux de souris Ts65Dn, des neurones dérivés d'iPSC et du tissu cérébral humain d'individus porteurs de trisomie 21. Nous avons exploré la morphologie des endosomes précoces dans ces modèles à l'aide de microscopie confocale, de microscopie à illumination structurée super-résolutive et de microscopie électronique après fixation chimique ou congélation à haute pression des échantillons.

La seconde partie s'intéresse à la **dynamique de l'endocytose et des voies de sortie des endosomes précoces**. Ces aspects ont été peu étudiés dans la trisomie 21, et très rarement quantifiés. L'objectif de cette partie a donc été double : caractériser la dynamique endosomale *per se* dans la trisomie 21 et apporter des informations pertinentes au regard des phénotypes morphologiques observés en première partie. Pour cela, nous avons utilisé des lignées de fibroblastes provenant d'individus euploïdes et porteurs de trisomie 21. Nous avons étudié l'internalisation de la transferrine par cytométrie en flux et microscopie confocale, le recyclage du récepteur à la transferrine par microscopie confocale et la cinétique de dégradation du récepteur à l'EGF par western blot.

La troisième partie a pour objectif d'évaluer **l'homéostasie moléculaire des endosomes précoces en condition trisomie 21**. A l'aide de western blots et d'imagerie confocale, nous avons mesuré les niveaux de différents régulateurs de la biologie des endosomes précoces : **Rab5, PI(3)P et EEA1**. L'implication de l'APP et de SYNJ1 dans la régulation des phosphoinositides nous a ensuite dirigés vers cette voie. Il a été montré que l'APP module PIKfyve, une kinase impliquée dans la conversion du PI(3)P et dans la maturation des endosomes (Shisheva, 2012). Nous avons testé l'effet de l'inhibition de cette kinase sur le niveau d'EEA1 et la production d'A β .

MATERIEL ET METHODES

Culture cellulaire et tissus

Lignées de cellules lymphoblastoïdes (Lymphoblastoid Cell Lines, LCL)

Les LCL ont été obtenues par immortalisation de lymphocytes B par le virus Epstein-Barr, selon (Tlili et al., 2012). Les LCL ont été cultivées en OptiMEM (Gibco, ThermoFisher Scientific) supplémenté en SVF (10 %) et pénicilline-streptomycine (1 %).

Fibroblastes

Les fibroblastes proviennent de Coriell Cell Repositories (lignée contrôle GM-05659 et lignée trisomique AG-05397), de l'institut Jérôme Lejeune (lignées trisomiques TOM et FRA) et de la cohorte ImaBio3 (lignées contrôles 94 et 69). Les caractéristiques de ces lignées sont présentées en table 3. Les cellules ont été cultivées en DMEM/GlutaMax (Gibco, ThermoFisher Scientific) supplémenté en SVF (10 %) et pénicilline-streptomycine (1 %). Les cellules ont étéensemencées à une densité de 20.000 cellules/cm². Un délai d'au moins 40 heures entre l'ensemencement des cellules et le début des expériences a été respecté. Les fibroblastes ont été utilisés entre les passages 8 et 20. Les passages étaient homogènes entre les lignées au sein de chaque expérience.

Le génotype APOE a été déterminé pour chaque lignée de fibroblastes. L'ADN génomique a été extrait avec le kit Nucleospin Tissue de Macherey Nagel selon les instructions du fabricant. L'exon 4 du gène de l'*APOE* contenant le SNP (single nucleotide polymorphism) correspondant aux allèles $\epsilon 2/\epsilon 3/\epsilon 4$ a été amplifié par PCR (polymerization chain reaction) avec les *primers* suivants : APOE sens 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3' ; APOE anti-sens 5'-ACAGAATTGCCCCGGCCTGGTACAC-3'. Pour chaque échantillon, le mélange de réaction contenait 200 ng d'ADN génomique, 3 μ L MyTaq Reaction Buffer (5X), 0,5 μ L de chaque primer sens et anti-sens (10 μ M) et 0,3 μ L de MyTaq HS DNA Polymerase (Bioline). Le programme de cycle est le suivant : préchauffage à 95°C pendant 1 minute, puis 30 cycles de dénaturation à 95°C pendant 15 secondes, hybridation à 68°C pendant 15 secondes, élongation à 72°C pendant 30 secondes puis élongation finale à 72°C pendant 5 minutes. Les fragments amplifiés ont été purifiés et séquencés par la société Genoscreen.

Génotype	Lignée	Age au prélèvement	Sexe	Génotype APOE
2N	GM	1	M	$\epsilon 2/\epsilon 3$
	94	66	M	$\epsilon 3/\epsilon 3$
	69	69	F	$\epsilon 3/\epsilon 3$
T21	AG	1	M	$\epsilon 3/\epsilon 3$
	TOM	21	M	$\epsilon 3/\epsilon 3$
	FRA	36	F	$\epsilon 2/\epsilon 4$

Table 3. Caractéristiques des lignées de fibroblastes provenant d'individus euploïdes et porteurs de trisomie 21

Souris Ts65Dn

Les souris Ts65Dn ont été obtenues du laboratoire Jackson et maintenues sur un fond B6C3HF1 par la reproduction de femelles Ts65Dn/B6EiC3 (SN005252) avec des mâles B6EiC3 (SN003647). Nous n'avons utilisé que des souris mâles dans notre étude car des différences entre souris mâles et femelles ont été observées au niveau de la taille et du nombre de neurones cholinergiques du prosencéphale basal (basal forebrain cholinergic neurons, BFCN), notre population neuronale d'intérêt.

Neurones humains isogéniques dérivés de cellules pluripotentes induites (induced Pluripotent Stem Cells, iPSC)

Les neurones humains dérivés d'iPSC ont été produits par le laboratoire de Dean Nizetic à Londres (Queen Mary University London). Le donneur présente une trisomie 21 en mosaïque (60 % de fibroblastes T21, 40 % de fibroblastes euploïdes). Les cellules euploïdes (2N) et trisomiques sont donc isogéniques. Les iPSC humaines trisomiques ont été générées à partir de fibroblastes issus d'une biopsie de peau par reprogrammation avec le virus de Sendaï. Elles ont été caractérisées et cultivées selon (Murray et al., 2015). La différenciation neuronale a débuté par la différenciation en NSC (Neural Stem Cells) par une double inhibition de la voie des SMAD. Pour la différenciation finale en neurones, les NSC ont étéensemencées entre les passages 7 et 9 sur des lamelles (épaisseur 0,17 mm $\pm$ 0,005 mm) traitées à la poly-L-ornithine et laminine (Sigma Aldrich), à une densité de 20,000-50,000 cellules/cm². Le jour suivant, le milieu a été remplacé par du milieu 3N supplémenté en BDNF et GDNF (10 ng/mL) (Peprotech), en cAMP (1 mM) et en acide ascorbique (200 nM) (Sigma Aldrich). Le milieu a

été changé deux fois par semaine et les neurones ont été fixés après 60 à 65 jours de différenciation (paraformaldéhyde, PFA, 4 %). Le clone contrôle C3 et le clone trisomique C5 ont été analysés.

Tissu cérébral d'individus porteur de trisomie 21

Des échantillons de cortex préfrontal de cerveaux *post-mortem* d'individus porteurs de trisomie 21 ont été fournis par Peter De Deyn et Debby Van Dam (Anvers, Belgique). Le cas présenté est un individu porteur de trisomie 21 âgé de 50 ans au décès. Cet échantillon a été stocké pendant 20 ans en formol 12 %.

Transfection

Les fibroblastes ont étéensemencés sur des lamelles (épaisseur 0.17 mm $\pm$ 0.005 mm) 48 heures avant la transfection. Le plasmide codant pour la sonde 2XFYVE-GFP (1 μ g/puit) a été transfecté avec la lipofectamine 2000 (ThermoFisher Scientific) dans du milieu OptiMEM (Gibco ThermoFisher Scientific) sans serum ni antibiotiques. 4 heures après la transfection, du milieu complet (DMEM/GlutaMax / SVF 10 % / pénicilline-streptomycine 1 %) a été ajouté au mélange de transfection. Le lendemain, les cellules ont été rincées puis fixées avant un immunomarquage d'EEA1.

Immunofluorescence

Immunocytochimie

Après avoir étéensemencées sur lamelles (épaisseur 0,17 mm $\pm$ 0,005 mm), les cellules ont été fixées en PBS (Phosphate Buffer Saline)/PFA 4 % pendant 10 minutes. Après une étape de diminution de l'autofluorescence du PFA par une incubation au NH₄Cl (50 mM), les cellules ont été perméabilisées en PBS/Triton X-100 0,2 % puis bloquées en PBS/BSA 3 %. Les cellules ont incubé dans la solution d'anticorps primaires dilués dans la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires utilisés sont : anti-EEA1 (rabbit monoclonal, C45B10, Cell Signaling, 1/500), anti-MAP2 (mouse monoclonal, MAB3418, Millipore, 1/500), anti-PI(3)P (mouse monoclonal, Z-P003, Echelon, 1/300). Les cellules ont été rincées 3 fois en PBS, puis incubées dans la solution d'anticorps secondaires dilués dans la solution de blocage pendant 1 heure à température ambiante (anti-rabbit Alexa Fluor 488 and anti-mouse Alexa Fluor 568, 1/1000, Invitrogen). Pour les fibroblastes, un contre-marquage de l'actine a été réalisé par ajout de phalloïdine fluorescente dans la solution d'anticorps

secondaires (Phalloidin Alexa Fluor 568, Invitrogen, 1/250). Enfin, les noyaux ont été marqués au DAPI (4',6-diamidino-2-phénylindole, 1 µg/mL, Vector Laboratories). Après 3 rinçages au PBS, les lamelles ont été montées sur lame, en Fluoromount-G pour la microscopie confocale ou en Vectashield (Vector Laboratories) pour la super-résolution. Les *z-stacks* de microscopie confocale ont été acquis sur un microscope confocal Leica TCS SP8 AOBS avec un objectif à immersion dans l'huile 63x/NA = 1,40 sur la plateforme ICMQuant.

Immunohistochimie sur souris Ts65Dn et tissus humains

4 souris WT et 5 souris Ts65Dn âgées de 4 mois ont été anesthésiées par injection intrapéritonéale de pentobarbital (60 mg/kg) and ont reçu une perfusion intra-aortique de PFA 4 % / Glutaraldéhyde 0,05 %. Les cerveaux ont été disséqués puis post-fixés en PFA 4 % / Glutaraldéhyde 0,05 % pendant une nuit puis stockés en PBS à 4°C avant d'être coupés. Des coupes coronales de 40 µm d'épaisseur ont été réalisées au vibratome (Microm) et stockées en PBS / azoture de sodium 0,4 % jusqu'à l'immunomarquage. Les échantillons de cortex préfrontal humain ont été coupés au vibratome (40 µm d'épaisseur) et les coupes ont été stockées en PBS/Azoture de sodium 0,4 % à 4°C jusqu'à l'immunomarquage.

Les coupes flottantes ont été rincées puis ont incubé dans la solution de blocage et perméabilisation (PBS/normal donkey serum 5 %/Triton X-100 0,2 %) pendant 1 heure, puis elles ont incubé dans la solution d'anticorps primaire (dilués dans la solution de blocage et perméabilisation) pendant une nuit à 4°C. L'anticorps primaire utilisé pour le tissu humain est anti-Rab5 (rabbit, polyclonal, 552108, Calbiochem, 1/500). Les anticorps primaires utilisés dans le tissu de souris sont anti-EEA1 (rabbit, C45B10, Cell Signaling, 1/400), anti-choline-acetyltransferase (ChAT) (goat, polyclonal, AB144P, Millipore, 1/300) et anti-NeuN (mouse, monoclonal, MAB377, Millipore, 1/500) et anti-cathepsin B (rabbit, polyclonal, PC41, Millipore, 1/1000). Les coupes sont ensuite incubées dans la solution d'anticorps secondaire (dilués dans la solution de blocage et perméabilisation). Les anticorps secondaires sont Alexa Fluor-488 donkey anti-rabbit, Alexa Fluor-555 donkey anti-goat et Alexa Fluor-647 donkey anti-mouse (ThermoFisher Scientific, 1/500). Les coupes ont ensuite été montées sur lames Superfrost Plus (ThermoScientific) et ont séché pendant 2 heures à température ambiante. Les coupes ont été réhydratées par 3 rinçages au PBS puis marquées au DAPI (10 µg/mL) et montées entre lame et lamelle (épaisseur 0,17 mm ± 0,005 mm) en Vectashield (Vector Laboratories) pour une observation en microscopie super-résolutive SR-SIM. Un anticorps anti-Rab5 a été utilisé dans le tissu humain car l'anticorps anti-EEA1 utilisé sur cellules en culture et tissu de souris ne fonctionne pas sur tissu humain. La spécificité du marquage Rab5

a été contrôlée avec un marquage en parallèle omettant l'anticorps primaire anti-Rab5. Pour les cerveaux de souris, les images ont été prises au niveau du plan de coupe équatorial des neurones, où le noyau est le plus large. 3 coupes de chaque animal ont été imagées. Au total, 24 neurones par type cellulaire et par animal ont été analysés (8 neurones de chaque type cellulaire sur chaque coupe). Les images de microscopie confocale des marquages EEA1/ChAT/NeuN ont été acquises sur un microscope confocal Leica TCS SP8 AOBS avec un objectif à immersion dans l'huile 63x/NA = 1,40 sur la plateforme ICM.Quant. Les images de microscopie confocale des marquages Cathepsine B/ChAT/NeuN ont été acquises sur un microscope confocal Leica AOBS AOTF SP2 avec un objectif à immersion dans l'huile 63x/NA = 1,40 sur la plateforme ICM.Quant.

Microscopie électronique

Microscopie électronique après fixation chimique et marquage avant inclusion

Après avoir été ensemencées sur lamelles Thermanox, les LCL et les fibroblastes ont été fixées en PBS/PFA 4 %/Glutaraldéhyde 0,1 % et cryoprotégées dans une solution de PBS/glycérol 30%/éthylène glycol 30% pour être stockées à -20°C. Après rinçages au PBS, les cellules ont été bloquées en PBS/5% normal goat serum puis incubées dans la solution d'anticorps primaire anti-EEA1 (rabbit monoclonal, C45B10, Cell Signaling, 1/1000) pendant une nuit à température ambiante. Les échantillons ont ensuite incubé dans la solution d'anticorps secondaire anti-rabbit biotinylé (Vector, CA, USA, 1/200) pendant 2 heures, puis ils ont incubés avec le complexe ABC peroxydase (Avidine/Biotin Complex) (Vectastain Elite, Vector, CA, USA) et révélés en diaminobenzidine (0,05 %). Après une post-fixation en OsO₄ (2 %) et une déshydratation des échantillons par une série de concentrations croissantes d'acétone comprenant une étape de coloration par 1 % d'acétate d'uranyle dans l'acétone 70 %, les lamelles ont été incluses en résine Epon. Les coupes de 70 nm d'épaisseur ont été légèrement marquées au citrate de plomb et observées au microscope électronique à transmission Philips CM120 (Philips, Eindhoven, The Netherlands) à 80kV. Les images ont été acquises avec une caméra digitale Morada (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany). La totalité des images de microscopie électronique du projet de thèse ont été obtenues en collaboration avec Jeanne Lainé à l'ICM et à l'Institut de Myologie (Hôpital Pitié-Salpêtrière).

Microscopie électronique après congélation à haute pression

Les fibroblastes ont étéensemencés sur des CryoCapsules (CryoCapCell, France). Ce sont des lamelles composées d'un disque en saphir sur lequel poussent les cellules, entouré d'un anneau d'espacement en or et d'un anneau de polyéthylène permettant de saisir la lamelle à l'aide d'une pince (Heiligenstein et al., 2014). Avant congélation, les capsules ont été scellées par un second disque de saphir reposant sur l'anneau d'espacement en or. Les fibroblastes ont été vitrifiés par congélation à haute pression sur le HPM Live μ (CryoCapCell, France). La vitrification permet de congeler l'échantillon tout en empêchant la formation de cristaux de glace. Après stockage des capsules dans l'azote liquide, les cellules ont subi une *freeze-substitution* (automatisé sur machine AFS-2, Leica microsystem) ayant pour but de déshydrater l'échantillon dans une solution d'acétone contenant de l'acétate d'uranyle 0,05 % (agent contrastant), du glutaraldéhyde 0,01 % (agent fixant) et 5 % d'H₂O. Les échantillons ont ensuite été inclus en Lowicryl HM20. Les étapes de congélation à haute pression, de *freeze-substitution* et d'inclusion ont été réalisées par Xavier Heiligenstein à l'Institut Curie (Paris). Les blocs ont été dégagés de leur CryoCapsules puis sectionnés en coupes ultra-fines (70 nm) recueillies sur des grilles à membrane. Les images de microscopie électronique à transmission ont été acquises selon les mêmes paramètres que ci-dessus. Les comptages de la surface des endosomes et du nombre d'endosomes par μm^2 de cytoplasme (densité numérique) ont été réalisés à partir d'images à grossissement x9700 sur le logiciel Icy. La surface du cytoplasme exclut le noyau. Entre 15 et 27 cellules ont été comptées dans 2 lignées de fibroblastes contrôles (GM et 94) et 3 lignées de fibroblastes trisomiques (AG, TOM et FRA). En l'absence de marquage spécifique des endosomes précoces, l'identification des endosomes précoces repose sur les caractéristiques décrites dans la littérature (Vogel et al., 2015), ainsi que sur l'aspect des endosomes EEA1-positifs que nous avons observé par microscopie électronique après fixation chimique dans les fibroblastes (figure 22 dans la section résultats). Nous avons compté les objets présentant une région vacuolaire transparente aux électrons, dépourvus d'un manteau entourant totalement la vésicule (type clathrine), parfois tubularisés et contenant quelques vésicules intraluminales ou matériel d'apparence filamentaire (illustration en figure 18).

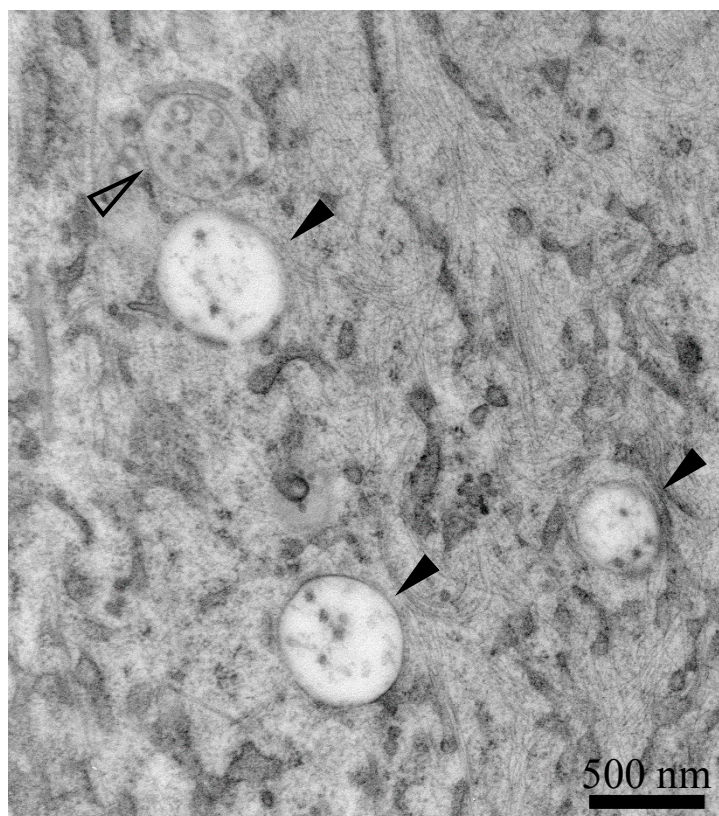


Figure 18. Illustration des critères d'identification des endosomes précoces en microscopie électronique après congélation à haute pression

Exemple de micrographe dans le cytoplasme d'un fibroblaste provenant d'un individu porteur de T21 (lignée TOM) illustrant les critères d'identification des endosomes précoces. Les endosomes précoces sont pointés par les flèches pleines, alors qu'un endosome tardif est pointé par la flèche vide. Les endosomes précoces ont une lumière plus transparente aux électrons que les endosomes tardifs. L'endosome tardif a également un nombre plus important d'ILV.

Microscopie électronique après immunohistochimie des BFCN

Les souris ont été perfusées et les cerveaux ont été disséqués et post-fixés comme décrits ci-dessus. Des coupes de 70 μm d'épaisseur ont été réalisées au vibratome (Microm). Après une étape de diminution de l'autofluorescence du PFA par une incubation à la glycine (0,1 M) et l'inhibition des peroxydase endogènes au H_2O_2 0,3 %, les coupes ont incubé dans la solution de blocage (PBS/BSA 5 %/normal donkey serum 5 %). Les coupes ont incubé dans la solution d'anticorps primaires : anti-EEA1 (rabbit, C45B10, Cell Signaling, 1/500) et anti-choline-acetyltransferase (ChAT) (goat, polyclonal, AB144P, Millipore, 1/200) dilués dans du PBS, pendant la nuit à température ambiante. Pour le marquage ChAT, les coupes ont incubé avec un anticorps secondaire donkey anti-goat conjugué à des nanoparticules d'or (Aurion, Pays-Bas, 1/50), puis ont été rincées, post-fixées en glutaraldéhyde 2 % pendant 10 minutes et ont subi une réaction d'amplification des nanoparticules à l'argent (HQ Silver, Nanoprobes).

Pour le marquage EEA1, les coupes ont incubé avec un anticorps secondaire anti-rabbit biotinylé (Vector, USA), puis elles ont incubé avec le complexe ABC peroxydase (Avidine/Biotin Complex) (Vectastain Elite, Vector, CA, USA) et ont été révélées en diaminobenzidine (0,05 %). La suite du protocole est identique au protocole de microscopie électronique sur cellules en culture avec marquage avant inclusion ci-dessus.

Microscopie super-résolutive SIM (3D Structured Illumination Microscopy)

La microscopie super-résolutive SIM a été réalisée sur un microscope SIM ELYRA (Zeiss), équipé d'un objectif à immersion à huile Plan Apochromat 63x/NA = 1,40 (Carl Zeiss). Les motifs d'illumination des lasers 405, 488 et 561 nm ont été appliqués sur les échantillons. La fluorescence émise a été détectée avec une caméra EMCCD (iXon 885, Andor Technology). Cinq phases de translation et trois rotations du motif d'illumination ont été appliquées sur chaque plan-z et des *z-stacks* ont été acquis (plans de 120 nm d'épaisseur sur l'axe z). Les *z-stacks* en 3 dimensions ont été reconstruits avec le logiciel d'imagerie ZEN (algorithme de Heintzmann et Cremer) pour générer des images super-résolues (SR-SIM), avec une résolution améliorée d'un facteur deux sur les trois axes (format de l'image reconstruite = 1904 x 1900 pixels, représentant des voxels de 0,04 x 0,04 x 0,12 μm). Le principe de la microscopie SR-SIM est présenté en figure 19. Les images de SR-SIM ont été réalisées avec Orestis Faklaris, à la plateforme ImagoSeine de l'Institut Jacques Monod.

Quantification des images de microscopie confocale et SR-SIM

Les images de morphologie des endosomes précoces ont été analysées et quantifiées avec le plugin Spot Detector du logiciel Icy (<http://icy.bioimageanalysis.org>). Ce plugin permet d'identifier des organelles intracellulaires telles que les endosomes et mesurer leur volume à partir d'images 3D grâce à une transformation de type « *undecimated wavelet transform* », basée sur les variations locales de fréquence dans les images. Cela permet notamment la détection de points malgré un bruit de fond important. Une région d'intérêt (ROI, region of interest) a été dessinée autour de chaque cellule, à partir du plan sur lequel la cellule est la plus large.

Dans les coupes de cerveaux de souris WT et Ts65Dn, chaque image présente de nombreux types cellulaires. Les neurones cholinergiques et non-cholinergiques ont été identifiés par les marquages ChAT et NeuN respectivement, permettant de tracer des ROI autour de chaque

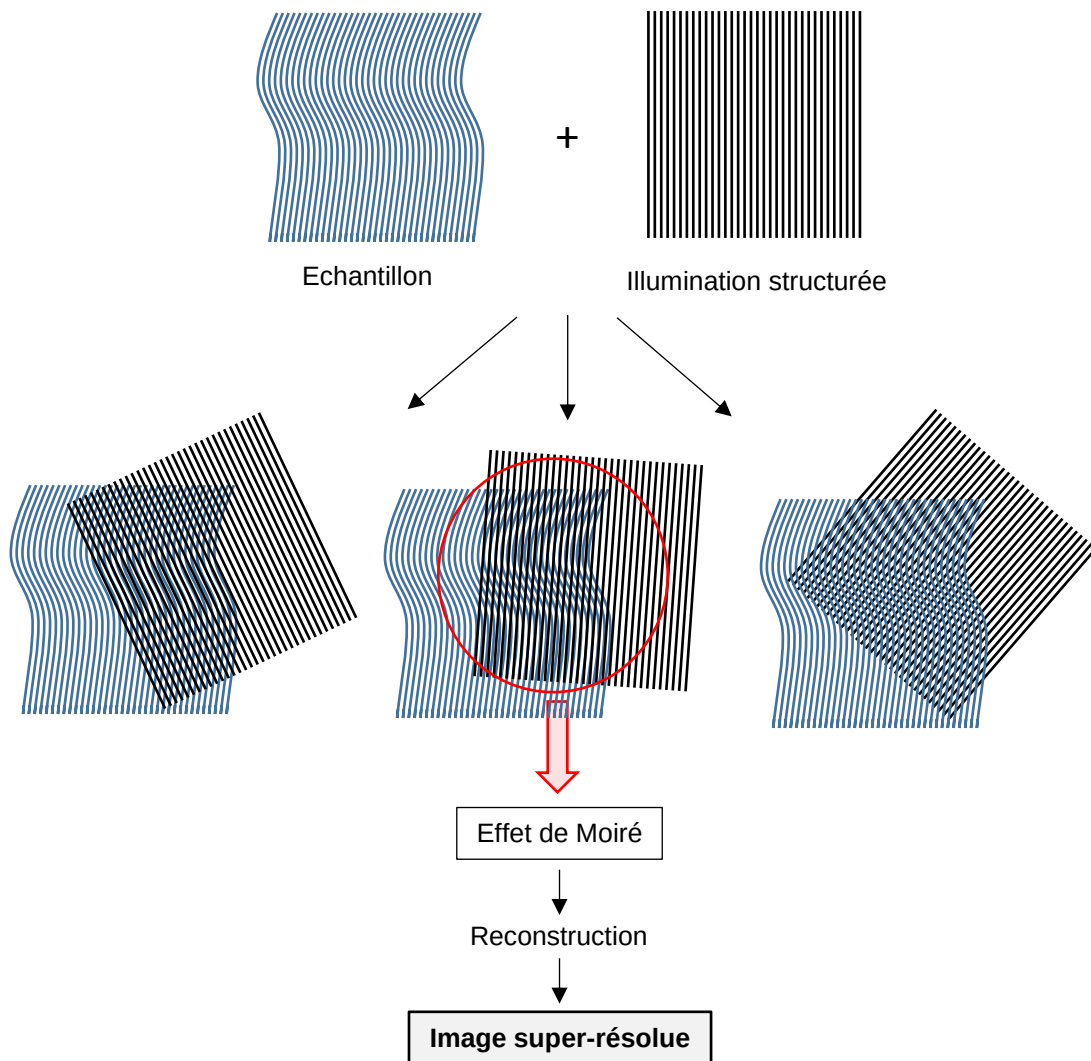


Figure 19. Principe de la super-résolution par illumination structurée (SR-SIM)

Une illumination structurée (motif en grille) de fréquence connue est utilisée pour illuminer l'échantillon (dont la fréquence est inconnue) à la longueur d'onde voulue. La haute fréquence de l'illumination combinée à la haute fréquence de l'échantillon génère un motif d'interférence de basse fréquence (effet de Moiré). Plusieurs rotations et translations du motif d'illumination sont nécessaires pour reconstruire informatiquement une image super-résolue. Cette technique permet d'atteindre une résolution latérale de 100 nm.

neurone. Les quantifications de surface des endosomes précoces ont été réalisées sur un plan par cellule avec le plugin Spot Detector de Icy.

Dans les figures 21, 26, 30, 34 et 37, les *z-stack* de microscopie confocale et SR-SIM sont présentés sous forme de projection maximale sur l'axe *z* afin de rendre compte de l'ensemble des endosomes précoces de la cellule. Dans les figures 27 et 28, les images présentées sont des plans seuls afin de pouvoir visualiser la forme des agrégats d'endosomes précoces.

Dans les neurones dérivés d'iPSC, le comptage des agrégats d'endosomes a été réalisé manuellement à partir des images binaires issues de la détection effectuée par le plugin Spot Detector. L'homogénéité du comptage a été vérifiée entre deux compteurs. Un agrégat est pris

en compte s'il contient plus de 3 endosomes précoces. Le nombre maximal observé d'endosomes par agrégat est de 8. Le nombre d'endosome dans chaque agrégat et le nombre d'agrégats ont été comptés.

Dans les fibroblastes, l'intensité de marquages fluorescents a été quantifiée afin d'en déduire un niveau de protéine ou de lipide. Pour ces quantifications, la fluorescence des z-stacks a été projetée sur un plan unique par addition des pixels. Une ROI a été dessinées autour de chaque cellule afin d'avoir la valeur d'intensité par cellule. La valeur moyenne du bruit de fond dans chaque image a été déterminée dans 3 ROI dépourvues de cellules. Ces valeurs moyennes de bruit de fond ont été soustraites aux valeurs d'intensité par cellules.

Cytométrie en flux après internalisation de transferrine

Les fibroblastes ont étéensemencés dans des flasques de culture de 25 cm². 48 heures plus tard, les fibroblastes ont été placés 15 minutes à 4°C afin d'arrêter l'endocytose, puis incubés avec de la transferrine Alexa Fluor 647 (25 µg/mL, T23366, Thermofisher Scientific) dans du milieu DMEM/GlutaMax sans sérum (Gibco, Thermofisher Scientific) pendant 4 minutes à 37°C. Le temps d'internalisation a été déterminé d'après une dynamique de l'internalisation de la transferrine en *pulse-chase*, observé au microscope confocal. Les cellules ont ensuite été décollées à la trypsine et resuspendues dans du milieu DMEM/GlutaMax supplémenté en SVF (10 %) et pénicilline-streptomycine (1 %). Les étapes suivantes ont été réalisées à 4°C afin d'empêcher la poursuite du transport de la transferrine dans la cellule, et notamment son exocytose par recyclage. Les cellules ont été centrifugées à 188 g pendant 5 minutes et resuspendues dans du PBS contenant un marqueur de mort cellulaire (NucGreen Dead 488, R37109, Invitrogen). Elles ont été à nouveau centrifugées à 100 g pendant 5 minutes, puis resuspendues dans 1 mL de PFA 1 %. La fixation a duré 10 minutes. 10 mL de PBS ont directement été ajoutés, puis les cellules ont été centrifugées à 100 g pendant 5 minutes et resuspendues dans 250 µL de PBS pour obtenir une concentration d'environ 1.10⁶ cellules/mL. La suspension de cellule a été analysée sur la cytomètre en flux MACSQuant (Miltenyi Biotec) de la plateforme Cyto-ICAN. Les données ont été analysées avec le logiciel FlowLogic (Miltenyi Biotec). La stratégie de *gating* a permis d'exclure les doublets et les cellules positives pour le marqueur de mort cellulaire.

Recyclage du récepteur à la transferrine

Le protocole de recyclage a été adapté de protocoles de la littérature (Tacheva-Grigorova et al., 2013). Après rinçages au PBS, les fibroblastes ont été placés à 4°C pendant 30 minutes en

DMEM/GlutaMax (sans sérum) afin d'arrêter l'endocytose. Les fibroblastes ont ensuite incubé avec de la transferrine Alexa Fluor 555 (25 µg/mL, T35352, Thermofisher Scientific) diluée dans du DMEM/GlutaMax pendant 1 heure à 4°C. Cette étape permet à la transferrine de se fixer à son récepteur membranaire sans être internalisée. Les fibroblastes ont ensuite été rincés sur glace et incubés en DMEM/GlutaMax/SVF 10 %/pénicilline-streptomycine 1 % supplémenté en transferrine Alexa Fluor 488 (100 µg/mL, T13342, Thermofisher Scientific), puis placés à 37°C pendant 15 minutes pour démarrer l'internalisation du complexe récepteur à la transferrine – transferrine Alexa Fluor 555. Ce temps d'incubation est suffisant pour que le récepteur à la transferrine recycle vers la membrane plasmique. Les cellules sont rincées sur glace puis fixées en PFA 4 % pendant 10 minutes. Dans notre étude, l'immunomarquage est réalisé post-fixation car l'incubation de l'anticorps primaire avant fixation ne permettait pas d'obtenir un signal satisfaisant. Les cellules sont ensuite immunomarquées contre le récepteur à la transferrine de surface, donc avec un protocole d'immunomarquage sans perméabilisation. En dehors de la perméabilisation, le protocole de marquage est identique à celui présenté ci-dessus. L'anticorps primaires est anti-CD71 (autre nom du récepteur à la transferrine) (rabbit monoclonal, 13208, Cell Signaling, 1/300). L'anticorps secondaire est anti-mouse Alexa Fluor 647 (donkey, A-31571, ThermoFisher Scientific, 1/1000). Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocal Leica TCS SP8 AOBS avec un objectif à immersion dans l'huile 63x/NA = 1,40 sur la plateforme ICMQuant.

Dégradation du récepteur à l'EGF (Epidermal Growth Factor Receptor, EGF-R)

Les fibroblastes ont été cultivés en DMEM/GlutaMax (déplété en sérum) pendant 6 heures avant une incubation dans l'EGF (50 ng/mL, E9644, Sigma) dilué dans du milieu DMEM/GlutaMax à 37°C pendant 30, 60, 90 et 120 minutes. Le temps 0 correspond aux cellules non-traitées après la déplétion en sérum. Le niveau d'EGF-R dans les lysats cellulaires a été quantifié par western blot.

Inhibition de PIKfyve

Les fibroblastes ont étéensemencés dans des puits de 3.8 cm² 48 heures avant traitement. Après des rinçages au PBS, les cellules sont incubées avec l'inhibiteur de PIKfyve YM201636 (1,6 µM dans le milieu de culture, Ab141370, Abcam) ou avec du DMSO (diméthylsulfoxyde)

pendant 24 heures à 37°C. Les lysats cellulaires ont été préparés (voir section « Western blot »), et le surnageant a été collecté pour que l'A β sécrété y soit dosé (voir section « Dosage A β »).

Western blot

Les fibroblastes ont été grattés dans du tampon RIPA (R0278, Sigma) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases (CompleteMini EDTA-free, Roche). Les échantillons ont été déposés sur des gels SDS-PAGE 4-20% Tris-Glycine (Mini-PROTEAN, Biorad), puis transférés sur des membranes de nitrocellulose (Santa Cruz). Après blocage dans du TBS/lait 5% pendant 1 heure, les membranes ont incubé dans la solution d'anticorps primaires dilués en TBS/Tween 0,1 %/BSA 5% pendant la nuit à 4°C. Les anticorps primaires utilisés sont : anti-EEA1 (monoclonal, C45B10, Cell Signaling, 1/500), anti-PI3K Class III (4263, Cell Signalling, 1/1000), anti-EGF-R (ab52894, Abcam, 1/1000), anti-GAPDH (CB1001, Millipore, 1/6000). Les membranes ont ensuite incubé dans la solution d'anticorps secondaires conjugués à la HRP (HorseRadish Peroxidase) anti-rabbit (1:5000, 31460, Thermofisher Scientific) ou anti-mouse (1:5000, 31430, Thermofisher Scientific) dilué en TBS/Tween 0.1 % pendant 1 heure, puis le substrat ECL (ElectroChemiLuminescence) a été appliqué (34580, Thermofisher Scientific) et les membranes ont été révélées sur des films ECL (Amersham Hyperfilm, GE). Les niveaux de protéines obtenus par western blot ont été mesurés dans ImageJ et ont été normalisés avec la quantité de protéine totale (rouge Ponceau) ou avec le signal GAPDH. Afin de pouvoir comparer les niveaux de protéines entre des expériences indépendantes, les niveaux de protéines en condition T21 ont été rapportés au niveaux observés en condition contrôle de chaque expérience.

Dosage A β

Le surnageant des cellules en culture a été récupéré dans des tubes en polypropylène (3213, Corning) et un cocktail d'inhibiteurs de protéases a été ajouté (CompleteMini EDTA free, Roche). Le dosage de l'A β sécrété dans les surnageants de culture cellulaire a été réalisé en utilisant le kit 4-spot multiplex A β peptide panel 1 6E10 (K15200E, MSD, MesoScaleDiscovery), permettant de doser l'A β ₃₈, l'A β ₄₀ et l'A β ₄₂. Après blocage de la plaque dans 150 μ L/puit de la solution de blocage fournie (Diluent 35) pendant 1 heure à température ambiante, 25 μ L d'échantillons sont ajoutés à 25 μ L de solution d'anticorps de détection pendant 2 heures à température ambiante. 150 μ L/puit de 2X MSD Read Buffer sont ajoutés afin de révéler le signal d'électrochemiluminescence puis la plaque est lue sur le MSD Imager

(Meso QuickPlex SQ120 Imager). Les données sont rapportées à une gamelle étalon et normalisées à la quantité de protéines mesurées par dosage Bradford dans le surnageant de chaque puit de culture.

Statistiques

Les données ont été analysées sur les logiciels Statistica et GraphPad Prism. L'ensemble des données est présenté avec l'effectif, la valeur moyenne et l'erreur-type (SEM, Standard Error of the Mean), suivis de la p-value du test statistique utilisé.

Comparaison de la surface ou du volume moyen des endosomes précoces

L'effet du génotype sur la surface ou le volume moyen des endosomes précoces quantifiés par microscopie électronique dans les LCL et par microscopie électronique et confocale dans les fibroblastes a été mesuré avec une analyse de variance (ANOVA) hiérarchisée à effets mixtes. L'effet aléatoire « cellule » est inclus dans l'effet aléatoire « individu », lui-même inclus dans l'effet fixe « génotype ». Ainsi, nous pouvons tester une différence globale entre les génotypes malgré une variabilité inter-cellulaire et inter-individuelle importante. Pour les neurones dérivés d'iPSC imagés par microscopie confocale et microscopie super-résolutive SIM, le même type d'analyse statistique a été effectué, mais sans facteur « individu » car les cellules proviennent d'un même individu porteur de la trisomie 21 en mosaïque. Quand cela s'est avéré nécessaire pour que les hypothèses de normalité et d'homoscédasticité soient vraies, les données ont subi une transformation logarithmique avant d'être analysées.

Comparaison du nombre moyen d'endosomes précoces par cellule

Dans les fibroblastes et les neurones dérivés d'iPSC, le volume cellulaire varie de manière importante, mais il est difficile à mesurer. Pour prendre en compte la taille des cellules dans l'analyse du nombre d'endosomes, le nombre d'endosomes par cellule a été rapporté à la surface de la ROI (surface de la cellule sur le plan le plus large) en microscopie confocale. En microscopie électronique après congélation à haute pression, le nombre d'endosome a été rapporté à la surface de cytoplasme dans lequel ils ont été comptés, excluant le noyau (en μm^2). Cela correspond donc à une densité numérique. En microscopie confocale et électronique, le nombre d'endosomes rapporté à la surface de la ROI (nombre/ μm^2) a été analysé par ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, où le facteur aléatoire « individu » est inclus dans le facteur fixe « génotype ». Dans les neurones dérivés d'iPSC, le nombre d'endosomes/ μm^2 a été analysé

avec un test de Mann-Whitney en raison de faibles effectifs, en microscopie confocale comme en microscopie super-résolutive SIM.

Comptages des agrégats d'endosomes précoces dans les neurones dérivés d'iPSC

Le nombre d'agrégats d'endosomes précoces et le nombre d'endosomes précoces par agrégat dans les neurones dérivés d'iPSC euploïdes et trisomiques ont été comparés avec un test non-paramétrique de Mann-Whitney, en raison de faibles effectifs. Les distributions des agrégats d'endosomes en fonction du nombre d'endosomes qui les compose ont été comparées avec un test exact de Fisher. Le test du Khi-deux n'était pas applicable en raison de faibles effectifs dans les classes de nombres élevés d'endosomes (au-delà de 6 endosomes précoces par agrégat).

Cytométrie en flux et microscopie confocale après internalisation de transferrine

Les intensités moyennes de fluorescence mesurées dans les fibroblastes euploïdes et trisomiques par cytométrie en flux et microscopie confocale ont été comparées par le test de Mann-Whitney.

Recyclage du récepteur à la transferrine

Les intensités moyennes de fluorescence obtenues après microscopie confocale dans les fibroblastes euploïdes et T21 ont été comparées par le test de Mann-Whitney.

Dégradation du récepteur à l'EGF

Les niveaux de récepteur à l'EGF obtenus par western blot ont été comparés avec une ANOVA à deux facteurs (facteur génotype et facteur *time-point*) suivie d'une comparaison multiple entre les génotypes pour chaque temps de traitement avec le test de Sidak.

Western blot et dosages d'A β

Les niveaux de protéines obtenus par western blot ont été comparés avec un test de Mann-Whitney. Les niveaux d'A β sécrétés et d'EEA1 après traitements au DMSO et YM201636 ont été comparés par une ANOVA à deux facteurs suivie d'une comparaison multiple entre tous les groupes avec le test de Tukey. Les niveaux d'EEA1 dont les valeurs de la condition YM201636 ont été rapportées aux valeurs de la condition DMSO pour chaque génotype ont été comparés avec un test de Mann-Whitney.

RESULTATS

1. Etude de la morphologie des endosomes précoces en haute résolution dans la trisomie 21

Objectif : La première partie du projet de thèse consiste à caractériser la morphologie des endosomes précoces (EP) dans différents modèles de la trisomie 21 (T21). La limite de résolution de la microscopie optique classique se situe dans l'échelle de taille des EP, nous avons donc voulu observer la morphologie des EP à l'aide d'imagerie confocale, microscopie électronique, et super-résolution optique (SR-SIM). Dans ce cadre, nous avons utilisé différents modèles : lignées de cellules lymphoblastoïdes, fibroblastes, neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) provenant d'un individu porteur de T21 (désigné par la suite « cellules T21 ») en mosaïque et cerveaux *post-mortem* d'individus atteints de T21.

1.1 Microscopie électronique dans des lignées de cellules lymphoblastoïdes (LCL)

Précédemment dans l'équipe, il a été montré que les EP EEA1- et Rab5-positifs de LCL T21 sont anormalement élargis en microscopie confocale (Cossec et al., 2012). Nous avons voulu observer les EP de ces LCL en microscopie électronique. Des coupes sériées de 50-70 nm d'épaisseur ont été imagées, permettant l'observation de l'ultrastructure des EP. Les précipités de diaminobenzidine (DAB) denses aux électrons révélant le marquage EEA1 sont observés autour de la membrane limitante des EP et s'étendent à quelques nanomètres des endosomes, comme décrit dans la littérature (Wilson et al., 2000) (figure 20).

En microscopie électronique, les EP EEA1-positifs des LCL T21 apparaissent nombreux et agrégés (figure 20a-d). Ces agrégats d'EP ont un diamètre d'environ 1 μm , correspondant au diamètre des EP élargis observés en microscopie confocale. La couleur rouge sur la figure 20c illustre ce que la résolution de la microscopie confocale permettrait théoriquement d'observer : on ne pourrait pas distinguer le détail de ces agrégats d'EP. On peut observer

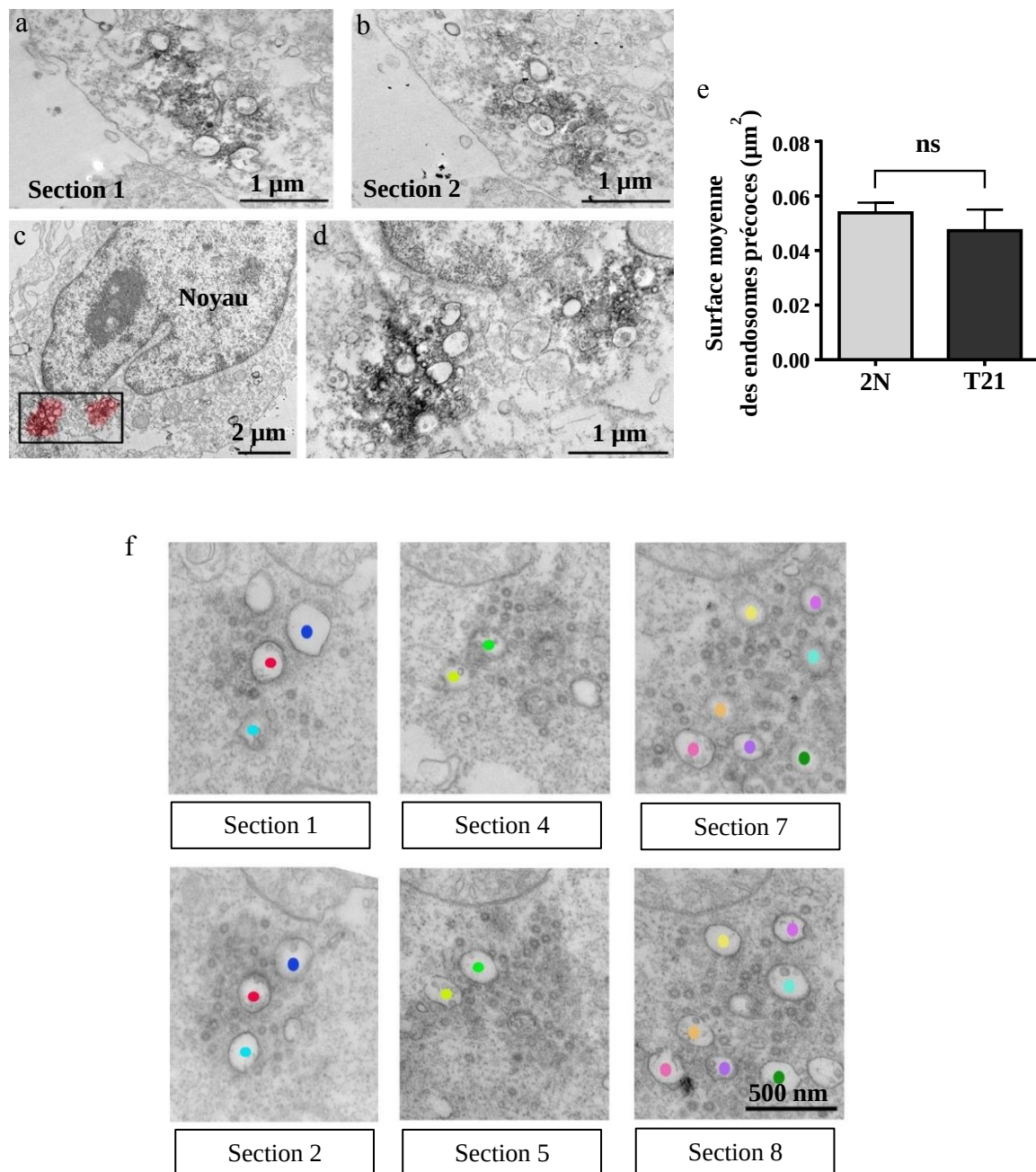


Figure 20. Endosomes précoces agrégés en microscopie électronique dans des LCL T21
a-d. Images représentatives d'agrégats d'endosomes précoces EEA1-positifs révélés par diaminobenzidine (a et b : agrégat suivi sur 2 coupes sériées ; c et d : agrégat agrandi sur l'image de droite, le halo représente ce qui serait théoriquement observé en fluorescence par microscopie confocale) e. Quantification de la surface moyenne des endosomes précoces dans des LCL euploïdes et T21. Il n'y a pas de différence significative de la surface moyenne des endosomes précoces entre les deux conditions (surface moyenne $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,566) (ns : non-significatif) f. Micrographes de coupes sériées montrant une densité importante d'endosomes précoces dans un LCL en condition T21. Les coupes 3 et 6 sont manquantes. Les endosomes précoces sont identifiés par des points de couleurs pour être suivis d'une coupe à l'autre.

quelques ILV dans certains EP. Les figures 20a, b et f montrent des agrégats d'EP sur des coupes sériées. On peut noter que les EP sont détachés les uns des autres, et qu'ils présentent peu de tubules. L'analyse morphométrique de la taille des EP ne montre pas de différence significative entre la surface moyenne des EP provenant des LCL euploïdes (2N) ($n = 28$ cellules, surface moyenne = $0,0538 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0037$) et des LCL T21 ($n = 43$ cellules, surface moyenne = $0,0473 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0078$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,566) (figure 20e). Des agrégats d'EP ont également été observés dans les LCL euploïdes, mais plus rarement et avec moins d'endosomes impliqués. Ces résultats montrent que les EP n'ont pas une taille modifiée dans les LCL T21 observés en microscopie électronique, et qu'ils ont tendance à s'agréger.

1.2 Microscopie confocale et électronique dans des fibroblastes

1.2.1 Microscopie confocale et microscopie électronique avec marquage avant inclusion

L'augmentation de la taille des EP dans les fibroblastes T21 a déjà été documentée (Cataldo 2008, Cossec 2012). En microscopie confocale, nous confirmons dans nos lignées que le volume moyen des EP est significativement plus élevé dans les fibroblastes trisomie 21 ($n = 3$ individus, volume moyen = $0,7921 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm 0,0219$) que dans les fibroblastes euploïdes ($n = 3$ individus, volume moyen = $0,6681 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm 0,0544$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,0342) (figure 21b). Ce résultat est illustré par des images représentatives de microscopie confocale (figure 21a). Comme déjà rapporté (Cossec 2012), le nombre moyen d'EP par cellule rapporté à la taille de la ROI n'est pas significativement différent entre les fibroblastes euploïdes ($n = 3$ individus, nombre moyen/surface ROI = $0,0854 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0113$) et les fibroblastes T21 ($n = 3$ individus, nombre moyen/surface ROI = $0,0808 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,004$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,726) (figure 21c). Ce résultat confirme l'élargissement des EP observés par microscopie confocale dans les fibroblastes T21.

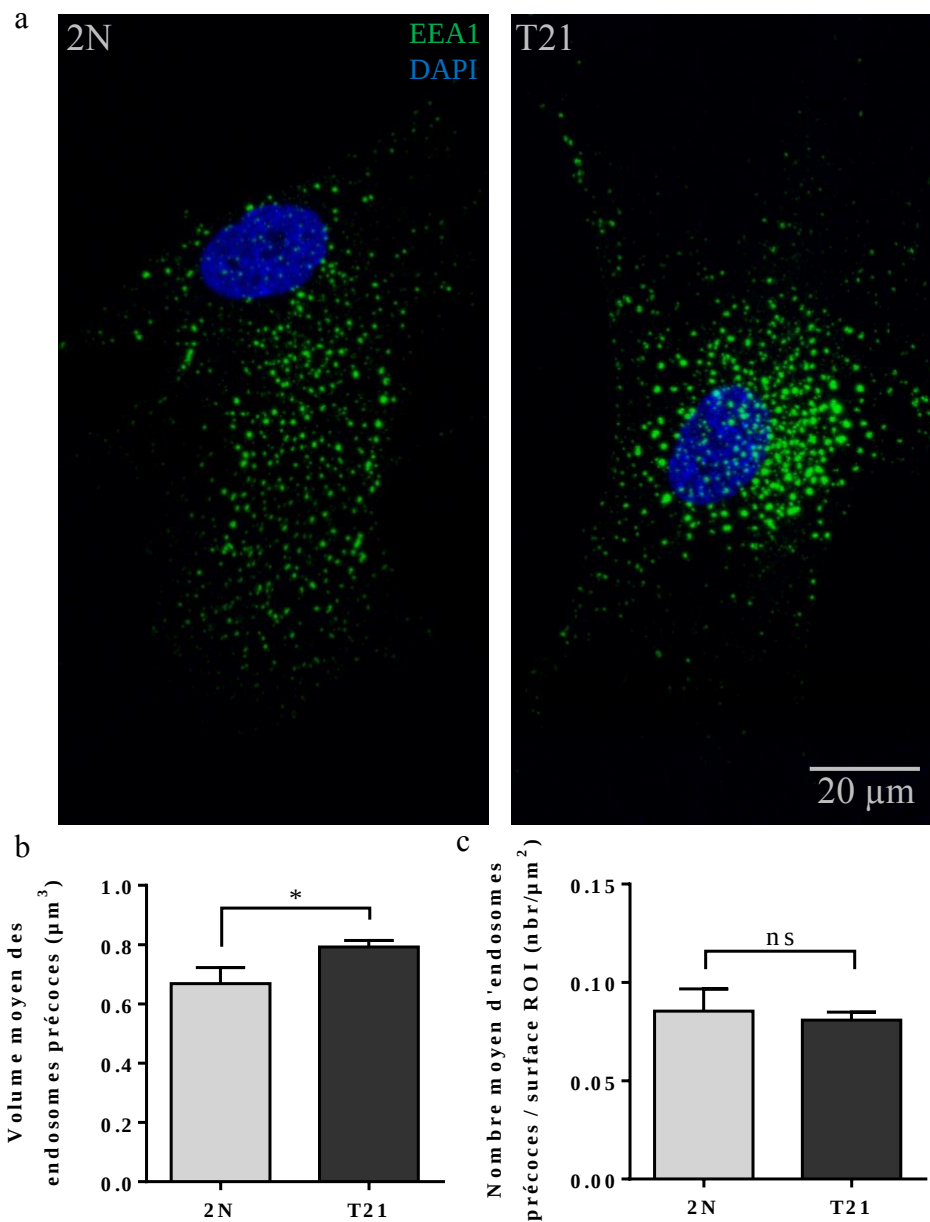


Figure 21. Analyse de la morphologie des endosomes précoces dans des fibroblastes par microscopie confocale

a. Images représentatives d'endosomes précoces EEA1-positifs en microscopie confocale dans un fibroblaste euploïde (gauche) et T21 (droite) b. Quantification du volume moyen des endosomes précoces dans des fibroblastes euploïdes et T21 en microscopie confocale, montrant que le volume moyen des endosomes précoces est significativement plus élevé dans les fibroblastes T21 (volume moyen $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,0342) c. Quantification du nombre moyen d'endosomes précoces par cellule. Le nombre d'endosomes précoces n'est pas significativement différent entre fibroblastes euploïdes et T21 (nombre moyen d'endosomes précoces par cellule/surface de la ROI $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,726). *p<0,05, ns : non-significatif.

Nous avons ensuite étudié la morphologie des EP par microscopie électronique, afin de déterminer si le phénotype d'agrégation d'un nombre important d'EP est également présent dans ce type cellulaire. D'abord, nous avons réalisé une expérience de microscopie électronique suite à la fixation chimique des échantillons et au marquage des EP avec un anticorps anti-EEA1 avant inclusion. Des micrographes représentatifs sont présentés en figure 22. Dans les fibroblastes T21, on observe un nombre important d'EP agrégés (agrandissement de la figure 22). On retrouve donc le phénotype observé par microscopie électronique dans les LCL en condition T21.

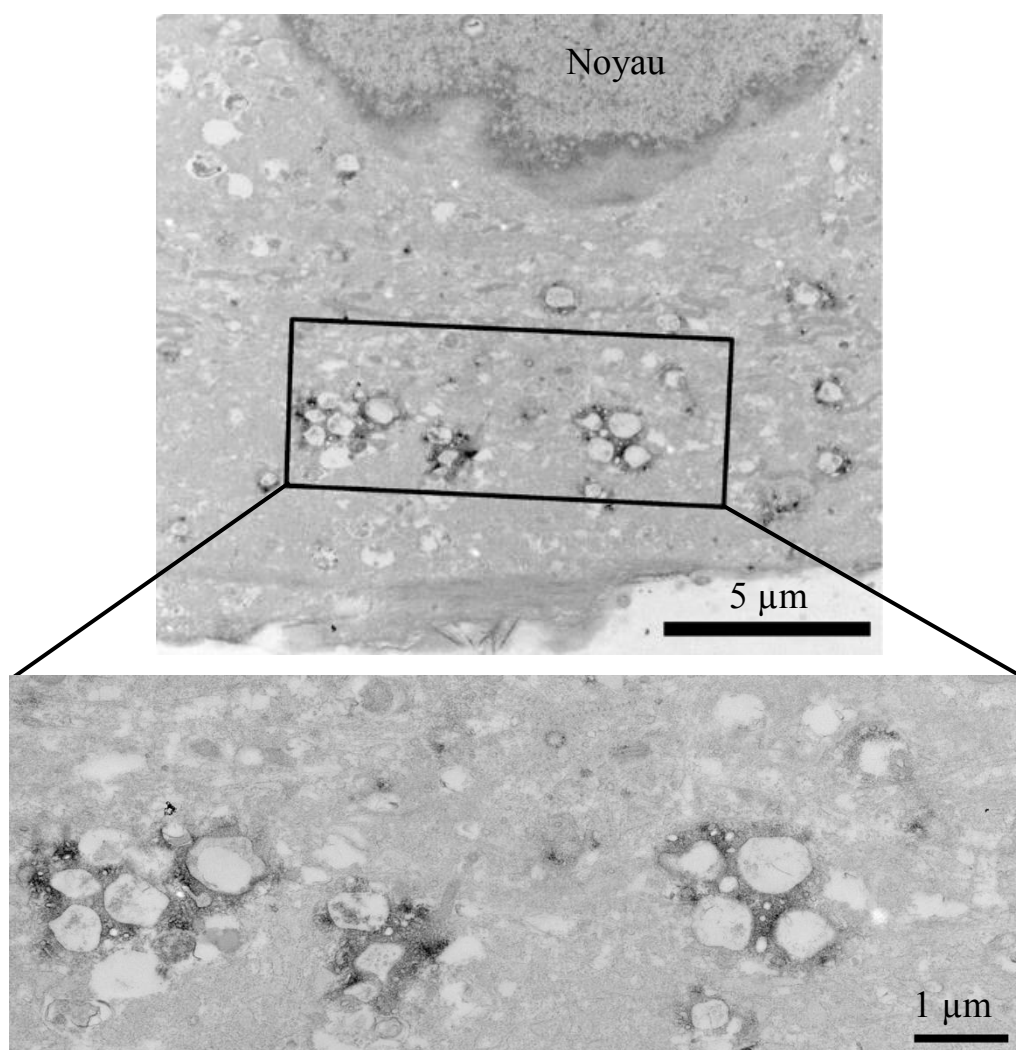


Figure 22. Micrographe d'un marquage EEA1 révélé par DAB en microscopie électronique après fixation chimique dans un fibroblaste provenant d'un individu porteur de T21

Les endosomes précoces marqués par EEA1 apparaissent nombreux et agrégés. On note leurs caractéristiques ultrastructurales (lumière transparente aux électrons, matériel intraluminal) qui permettent ensuite d'identifier les endosomes précoces dans la microscopie électronique après congélation à haute pression (sans marquage EEA1).

1.2.2 Microscopie électronique après congélation à haute pression

Nous avons ensuite réalisé une expérience de microscopie électronique après congélation à haute pression des échantillons. Il a été montré que la fixation aux aldéhydes peut entraîner des artefacts (Murk et al., 2003), et nous voulions exclure toute observation artéfactuelle quant à l'agrégation des EP dans les cellules T21. La vitrification de l'échantillon en 10 ms permet de préserver l'ultrastructure des compartiments intracellulaires.

Les résultats sont présentés en figure 23. En figure 23a, on peut observer les cytoplasmes d'un fibroblaste euploïde et un fibroblaste T21, où l'on peut voir des EP. Les encarts agrandis montrent des exemples d'EP dans les deux conditions. On note que les EP sont nombreux en condition T21. En outre, on observe souvent des faisceaux denses d'actine dans le cytoplasme des fibroblastes T21. Ils sont visibles sur la gauche de l'image T21 de la figure 23a (têtes de flèche).

La quantification de la surface moyenne des EP ne montre pas de différence significative entre les fibroblastes euploïdes ($n = 2$ individus, surface moyenne = 91282 nm^2 , SEM ± 11061) et les fibroblastes porteurs de T21 ($n = 3$ individus, surface moyenne = 113301 nm^2 , SEM ± 6760) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,4875), malgré une tendance. En revanche, la quantification de la densité numérique des EP met en évidence une augmentation du nombre d'EP dans les fibroblastes T21 ($n = 3$ lignées, densité numérique moyenne = $0,0577 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,004$) par rapport aux fibroblastes euploïdes ($n = 2$ lignées, densité numérique moyenne = $0,0328 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0044$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,0309). Cette expérience confirme que les EP ne sont pas anormalement élargis en condition trisomique, et montre qu'ils sont plus nombreux. En microscopie électronique après congélation à haute pression des échantillons, on observe rarement des agrégats d'EP semblables à ceux observés après fixation des échantillons en condition T21.

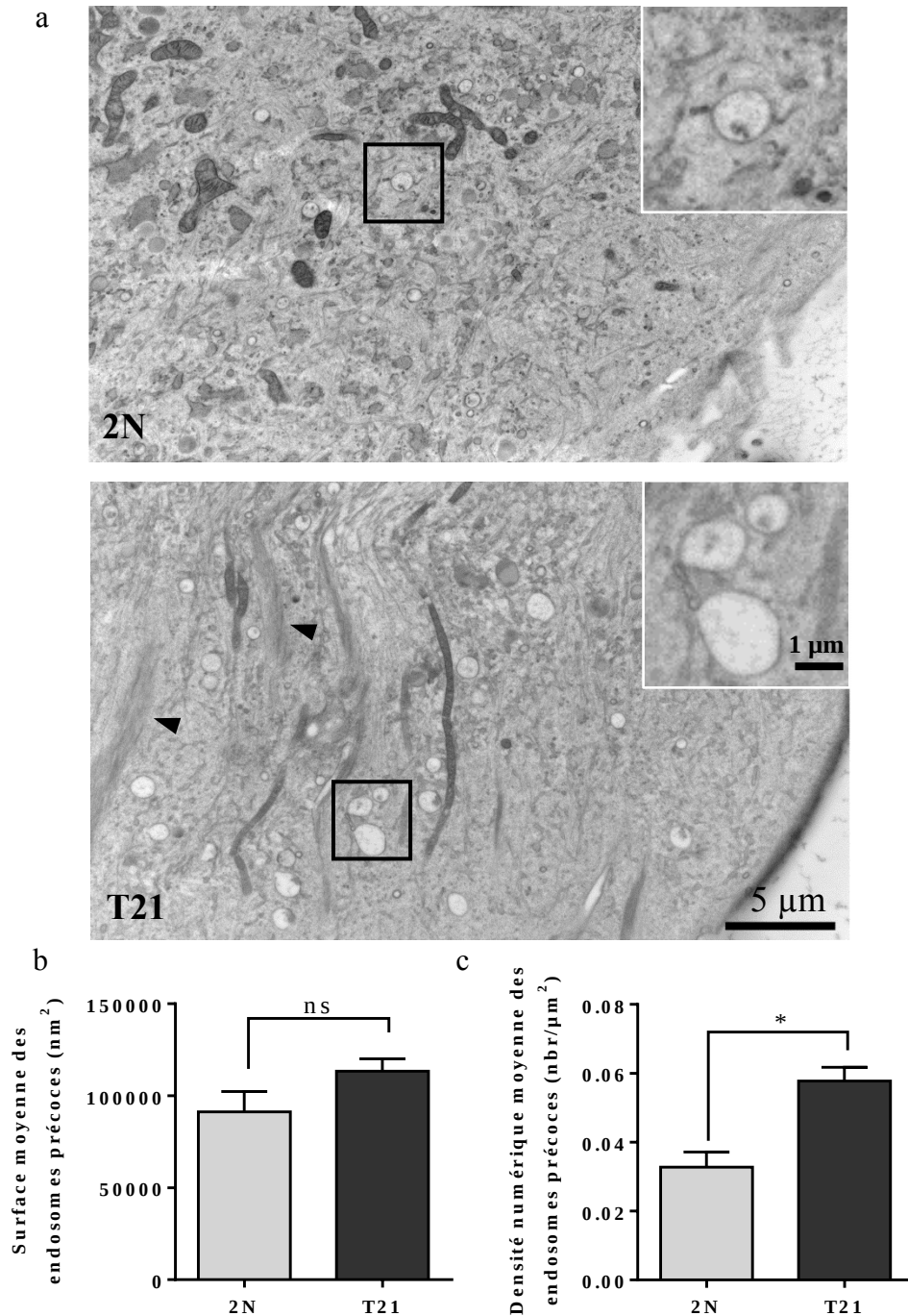


Figure 23. Augmentation de la densité d'endosomes précoces dans des fibroblastes T21 analysés par microscopie électronique après congélation à haute pression

a. Micrographe d'un fibroblaste euploïde et d'un fibroblaste T21. En condition euploïde on observe quelques endosomes précoces, plus nombreux dans le fibroblaste T21. Les zones délimitées en noir sont agrandies pour donner un exemple d'endosomes précoces dans les deux conditions. Les têtes de flèche pointent les faisceaux d'actine observés en condition T21 b. Quantification de la surface moyenne des endosomes précoces dans des fibroblastes euploïdes et T21. Il n'y a pas de différence significative de la surface des endosomes précoces entre les deux conditions (surface moyenne $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,4875) c. La densité numérique moyenne des endosomes est significativement augmentée dans les fibroblastes T21 par rapport aux fibroblastes euploïdes (densité $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,0309). *p<0,05, ns : non-significatif.

1.3 Microscopie confocale et électronique dans des BFCN de souris Ts65Dn

Après l'utilisation de modèles cellulaires, nous avons recherché la présence d'anomalies morphologiques des endosomes chez la souris. Nous avons analysé la morphologie des EP dans le cerveau de la souris Ts65Dn, modèle de la T21. La souris Ts65Dn porte une duplication segmentaire du chromosome 16 murin, impliquant une tripllication de 92 gènes orthologues au chromosome 21 humain (Sturgeon and Gardiner, 2011). Ces souris présentent des anomalies cellulaires et comportementales homogènes avec le phénotype de la maladie d'Alzheimer et de la T21 : perte des neurones cholinergiques du cerveau antéro-basal dans la région du septum (BFCN, basal forebrain cholinergic neurons), malgré une absence de pathologie amyloïde (Holtzman et al., 1996), et des déficits d'apprentissage et de mémoire. Nos observations histologiques sont concentrées sur les neurones cholinergiques du septum (MSN, medial septal nucleus). En effet, ces neurones qui projettent sur le néocortex et l'hippocampe dégénèrent dans les deux pathologies, ce qui entraîne des troubles cognitifs observés dans la maladie d'Alzheimer. D'abord, nous avons immunomarcqué les EP sur coupes flottantes de souris WT (Wild-Type) et Ts65Dn mâles de 4 mois avec un anticorps anti-EEA1, puis réalisé des images en microscopie confocale (figure 24). La surface moyenne des EP est significativement augmentée dans les neurones cholinergiques de souris Ts65Dn ($n = 5$ souris, surface moyenne = $0,137 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0075$) par rapport aux souris WT ($n = 4$ souris, surface moyenne = $0,1159 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0185$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,0432) (figure 24a, b). Afin de savoir si l'augmentation de la taille des EP est spécifique à la population neuronale des BFCN, nous avons également quantifié la surface moyenne des EP dans les neurones non-cholinergiques du MSN (figure 24c) et dans les neurones cholinergiques du striatum (figure 24d). Nous n'avons pas trouvé de différence significative de la surface des EP dans les neurones non-cholinergiques du MSN (WT : $n = 4$ souris, surface moyenne = $0,0873 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0118$; Ts65Dn : $n = 5$ souris, surface moyenne = $0,1128 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0087$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,4304) et dans les neurones cholinergiques du striatum MSN (WT : $n = 4$ souris, surface moyenne = $0,083 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0089$; Ts65Dn : $n = 5$ souris, surface moyenne = $0,0955 \mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0085$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,6664) de souris Ts65Dn par rapport aux souris WT. On note cependant une tendance à l'augmentation dans ces deux types neuronaux.

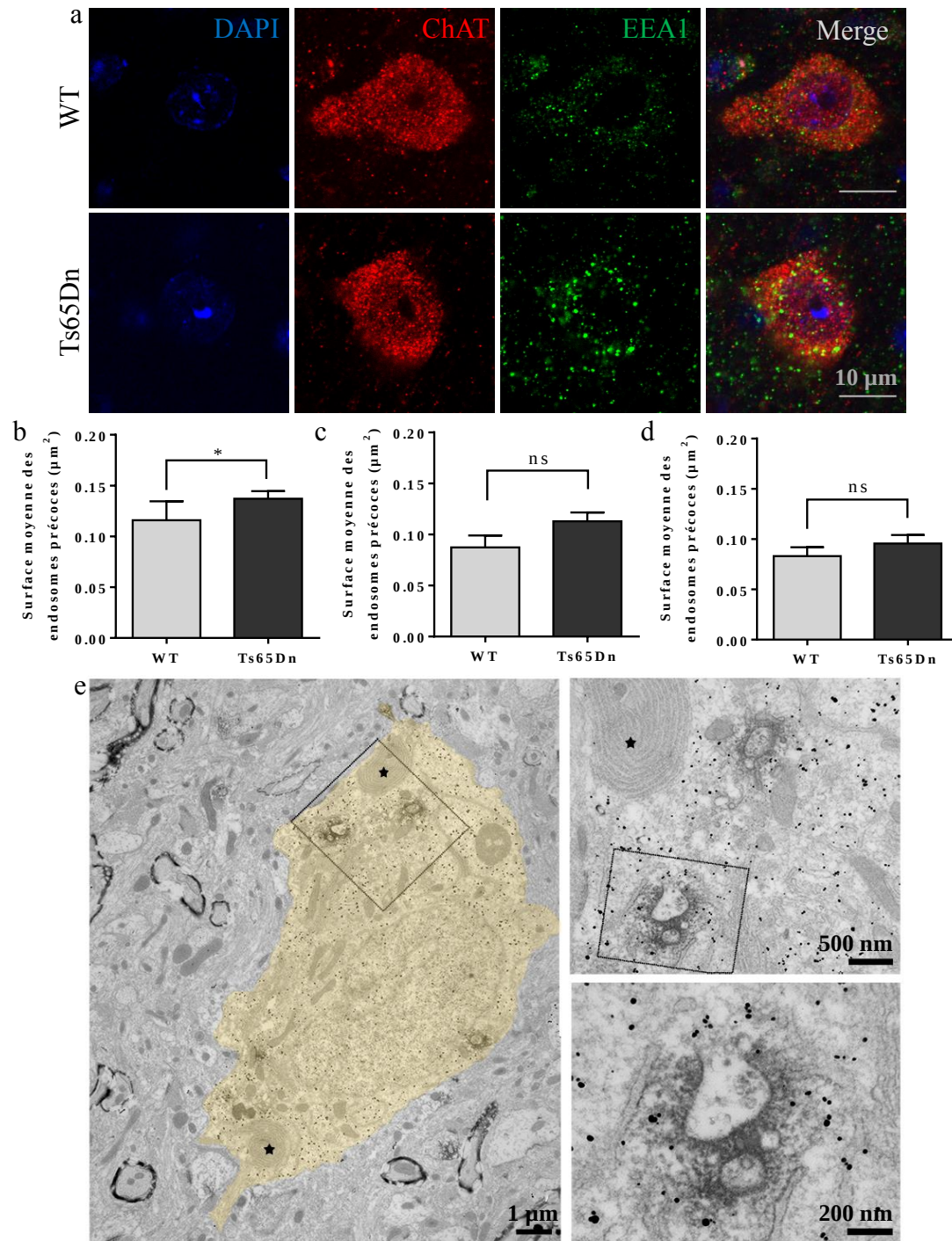


Figure 24. Morphologie des endosomes précoces chez la souris Ts65Dn

a. Images représentatives d'un marquage EEA1 (vert) dans les BFCN du MSN (ChAT-positif, rouge) de souris WT et Ts65Dn b. Les quantifications montrent une augmentation significative de la surface des endosomes précoces dans les BFCN de souris Ts65Dn par rapport aux souris WT (surface moyenne $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,0432) c. Les quantifications ne révèlent pas de différence significative de la surface des endosomes précoces entre les souris WT et Ts65Dn dans les neurones non-cholinergiques du MSN (surface moyenne $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,4304) et d. dans les neurones cholinergiques du striatum (surface moyenne $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,6664) e. Endosomes précoces EEA1-positifs dans un BFCNn de souris Ts65Dn. Le BFCN est marqué à l'or (marquage de ChAT) et EEA1 est révélé en diaminobenzidine. Un agrégat d'endosomes précoces est agrandi. * $p < 0,05$, ns : non-significatif.

Nous avons ensuite étudié l'ultrastructure des EP dans les neurones cholinergiques du septum de souris WT et Ts65Dn en microscopie électronique (figure 24). Nous avons observé la formation d'agrégats d'endosomes dans les souris Ts65Dn. Nous avons observé 15 BFCN d'une souris Ts65Dn dans lesquels nous avons compté 19 agrégats d'EP au total, soit une moyenne de 1,27 agrégats par neurone. Dans la souris WT, nous avons observé 22 BFCN dans lesquels nous avons compté 14 agrégats d'EP au total, soit une moyenne de 0,64 agrégats par neurone. Les agrégats que nous observons dans les souris Ts65Dn semblent faire intervenir moins d'EP que dans nos modèles de cellules périphériques en culture. Néanmoins, ces observations renforcent l'hypothèse initiale de taille normale/agrégation des EP dans la T21 et montrent que ce phénotype n'est pas restreint aux cellules en culture mais qu'il est également présent dans le cerveau d'un animal modèle de la T21.

Nous avons également observé la morphologie des lysosomes cathepsine B-positifs dans les BFCN du MSN de souris Ts65Dn (figure 25). Les lysosomes ne semblent pas avoir une taille modifiée dans ces neurones entre souris WT et Ts65Dn. En revanche, ils semblent être plus nombreux dans le soma des BFCN de souris Ts65D par rapport aux souris WT. Ces observations sont confirmées par des quantifications préliminaires (non montré).

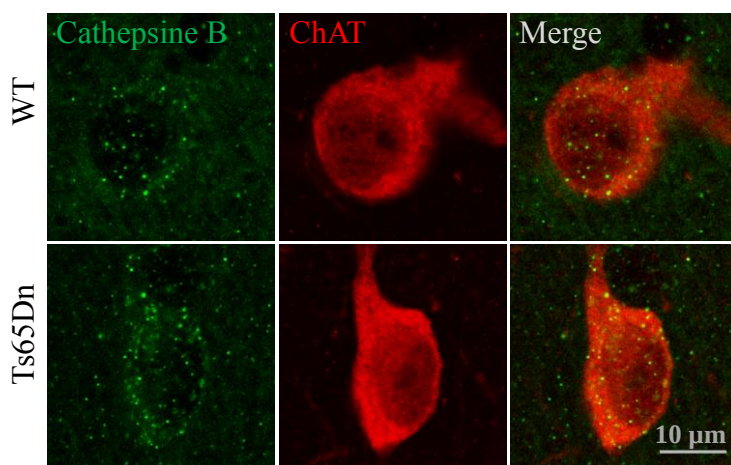


Figure 25. Morphologie des lysosomes chez la souris Ts65Dn

Images représentatives d'un marquage cathepsine B (vert) dans des BFCN du MSN (ChAT-positifs, rouge) dans une souris WT et une souris Ts65Dn.

1.4 Microscopie confocale et super-résolution SIM (SR-SIM) dans des neurones humains isogéniques dérivés d'iPSC

1.4.1 Microscopie confocale

Après avoir montré que les EP ne sont pas élargis dans deux modèles cellulaires périphériques et dans les BFCN de souris modèle de la T21, nous avons voulu analyser la taille des EP dans un modèle neuronal humain de la T21. Grâce à une collaboration avec le laboratoire de Dean Nizetic (Londres, Royaume-Uni), nous avons obtenu des neurones dérivés de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) générées à partir de fibroblastes provenant d'un individu porteur de T21 en mosaïque (60 % de cellules trisomiques, 40 % de cellules euploïdes). Cette équipe a donc obtenu des clones d'iPSC isogéniques à l'exception de la copie excédentaire du chromosome 21 (Murray et al., 2015). Ce type de modèle n'a jamais été utilisé auparavant dans les études portant sur les anomalies endosomales dans la T21.

D'abord, nous avons étudié la morphologie des EP dans ces neurones par microscopie confocale. Des images représentatives des marquages EEA1 et MAP2 (marqueur neuronal) sont présentées en figure 26a. La quantification de la taille des EP montre une augmentation significative de leur volume moyen des EP dans les neurones T21 ($n = 20$ cellules, volume moyen = $0,0533 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm 0,0028$) par rapport aux neurones euploïdes ($n = 20$ cellules, volume moyen = $0,0477 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm 0,0033$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,03) (figure 26b). Ce résultat fournit la première preuve d'une anomalie endosomale dans des neurones humains trisomiques dérivés d'iPSC. Nous avons également quantifié le nombre d'EP rapporté à la surface de la ROI, qui est significativement plus élevé dans les neurones T21 ($n = 20$ cellules, nombre moyen/surface ROI = $1,3411 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0555$) par rapport aux neurones euploïdes ($n = 20$ cellules, nombre moyen/surface ROI = $1,0941 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0536$) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,0043) (figure 26c).

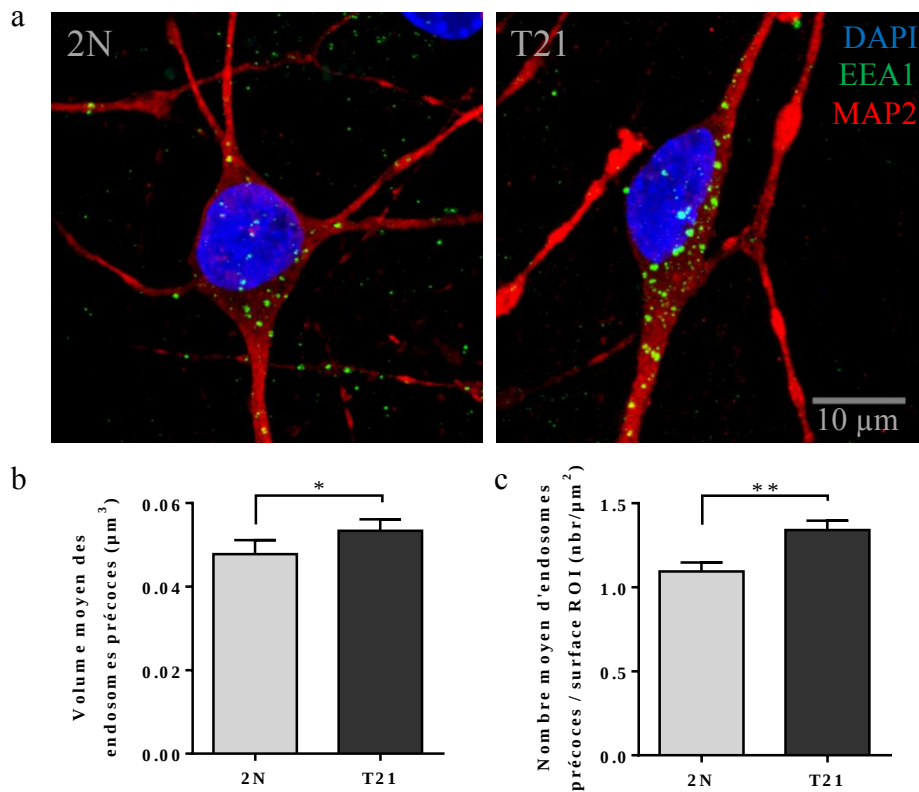


Figure 26. Analyse de la morphologie des endosomes précoces dans des neurones dérivés d'iPSC provenant d'un individu portant une T21 en mosaïque en microscopie confocale
a. Images représentatives d'endosomes précoces EEA1-positifs en microscopie confocale dans un neurone euploïde et un neurone trisomique b. Quantification du volume moyen des endosomes précoces dans les neurones euploïdes et trisomiques en microscopie confocale. Les endosomes précoces sont significativement plus grands dans les neurones trisomiques (volume moyen $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,03) c. Quantification du nombre moyen d'endosomes précoces par cellule. Les endosomes précoces sont significativement plus nombreux dans les neurones T21 (nombre moyen d'endosomes précoces par cellule/surface de la ROI $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,0043). *p<0,05, **p<0,01.

1.4.2 Microscopie SR-SIM

Afin d'étudier la morphologie des EP dans les neurones humains isogéniques dérivés d'iPSC à plus haute résolution, nous avons observé ces neurones en microscopie SR-SIM. Cette technique améliore la résolution d'un facteur deux sur tous les axes, soit une résolution latérale d'environ 100 nm et une résolution en profondeur d'environ 200 nm, permettant d'obtenir des images super-résolue en 3 dimensions. Elle est donc particulièrement adaptée à l'observation et la discrimination d'EP adjacents. De plus, elle n'impose pas de préparation particulière de l'échantillon. La figure 27a montre un champ observé en microscopie confocale en haut et en

SR-SIM en bas dans un neurone T21 (marquage EEA1). On peut observer que les EP élargis dans l'image de microscopie confocale correspondent à des EP de taille normale dans l'image de SR-SIM. Les EP agrégés ne sont pas observables en microscopie confocale et apparaissent comme une seule vésicule de grande taille.

La quantification de la taille des EP dans les images de SR-SIM de ces neurones montre que le volume moyen des EP n'est pas significativement modifié entre les neurones euploïdes ($n = 11$ cellules, volume moyen = $0,0165 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm 0,0012$) et les neurones T21 ($n = 14$ cellules, volume moyen = $0,0147 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm 0,0009$) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,9528) (figure 27b). Le nombre d'EP par cellule rapporté à la surface de la ROI est significativement plus faible dans les neurones T21 ($n = 14$ cellules, nombre moyen/surface ROI = $0,8862 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,0524$) que dans les neurones euploïdes ($n = 11$ cellules, nombre moyen/surface ROI = $1,313 \text{ EP}/\mu\text{m}^2$, SEM $\pm 0,1467$) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,0152) (figure 27c).

Les images de SR-SIM montrent que les EP élargis observés en microscopie confocale sont en réalité de taille normale mais ayant tendance à s'agréger. Nous avons donc quantifié le nombre d'agrégats d'EP dans les images de SR-SIM. Ce nombre est rapporté au nombre total d'EP dans chaque cellule. Le nombre moyen d'agrégats d'EP par cellule est significativement augmenté dans les neurones T21 ($n = 14$ cellules, nombre d'agrégats/nombre total d'endosomes = 0,0639 agrégats/nbr endosomes, SEM $\pm 0,0054$) par rapport aux neurones euploïdes ($n = 10$ cellules, nombre d'agrégats/nombre total d'endosomes = 0,04859 agrégats/nbr endosomes, SEM $\pm 0,0036$) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,0467) (figure 27d). Le nombre moyen d'EP par agrégat n'est pas modifié entre les neurones euploïdes ($n = 10$ cellules, nombre d'endosomes par agrégat = 3,616 endosomes/agrégats, SEM $\pm 0,0764$) et les neurones T21 ($n = 14$ cellules, nombre d'endosomes par agrégat = 3,949 endosomes/agrégats, SEM $\pm 0,1766$) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,159) (figure 27e). Enfin, nous avons analysé la distribution des agrégats en fonction du nombre d'EP qui les composent dans les deux conditions. Les distributions ne sont pas significativement différentes (test exact de Fisher, p-value = 0,2996) (figure 27f). On note cependant une tendance vers un décalage des distributions en faveur d'un plus grand nombre d'EP composant les agrégats dans les neurones T21.

Ces résultats indiquent que les EP élargis observés en microscopie confocale correspondent à des EP de taille normale ayant tendance à s'agréger dans des neurones humains trisomiques en culture. Les agrégats observés en condition T21 sont plus nombreux qu'en condition euploïde, mais ils ne sont pas significativement composés de plus d'EP.

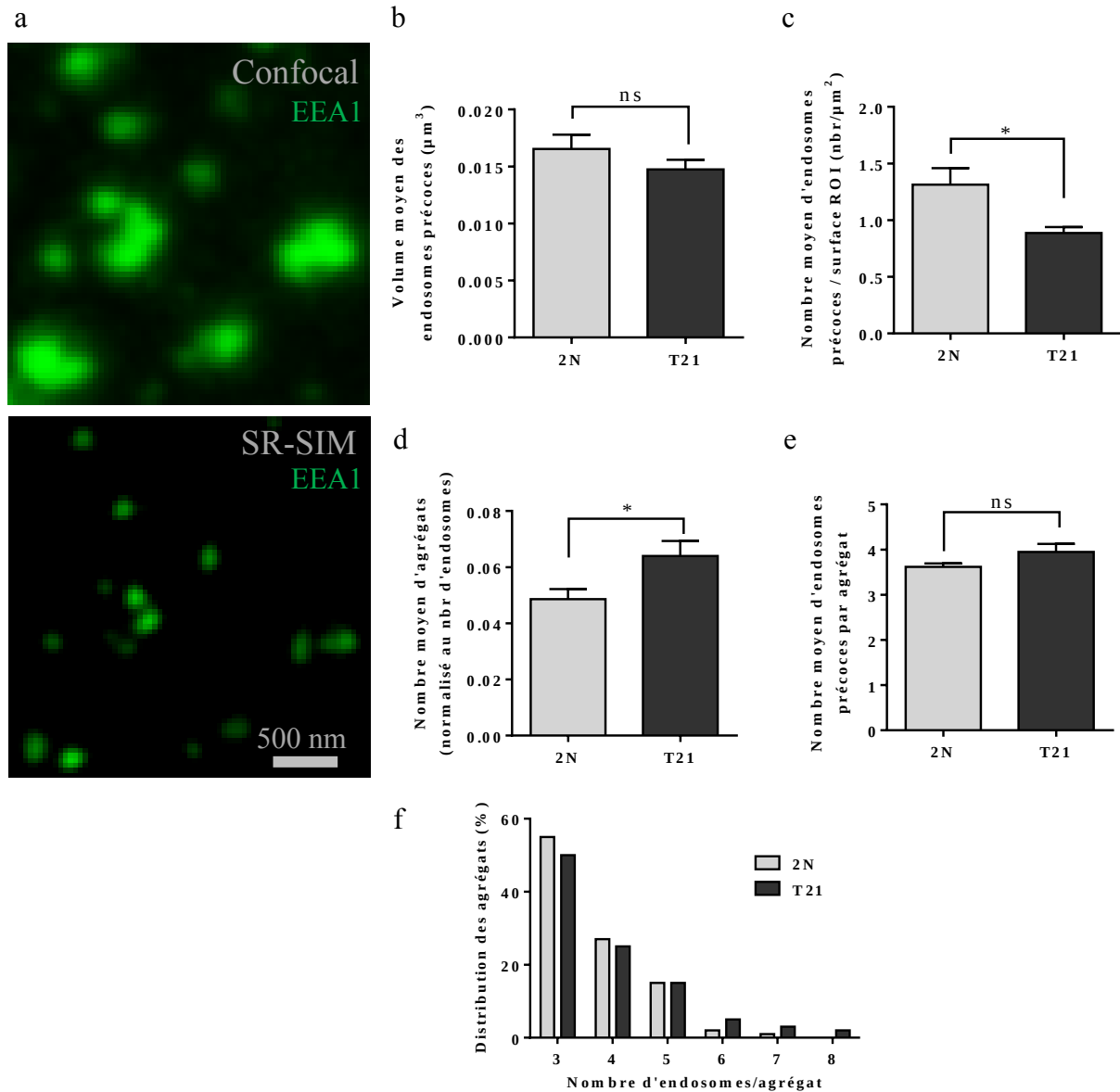


Figure 27. Microscopie super-résolutive par illumination structurée (SR-SIM) dans des neurones dérivés d'iPSC provenant d'un individu portant une T21 en mosaïque

a. Images représentatives d'endosomes précoces EEA1-positifs d'un neurone T21 en microscopie à champ large (gauche) et microscopie SR-SIM. Le SR-SIM permet de distinguer des endosomes précoces individuels agrégés b. Le volume moyen des endosomes précoces n'est pas significativement différent entre neurones euploïdes et T21 (volume moyen $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,9528) c. Les endosomes précoces sont significativement moins nombreux dans les neurones T21 que dans les neurones euploïdes (nombre moyen d'endosomes précoces par cellule/surface de la ROI $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,0152) d. Le nombre moyen d'agrégats est significativement plus élevé dans les neurones T21 (nombre moyen d'agrégat/nombre total d'endosomes $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, p-value = 0,0467) e. Le nombre d'endosomes par agrégat n'est pas différent entre neurones euploïdes et T21 (nombre moyen d'endosome/agrégat $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, p-value = 0,159) f. La distribution des agrégats en fonction du nombre d'endosomes qui les compose montre une tendance non-significative à l'augmentation de la proportion d'agrégats ayant beaucoup d'endosomes en condition T21 (test exact de Fisher, p-value = 0,2996). *p<0,05, ns : non-significatif.

1.5 Microscopie SR-SIM dans le cortex préfrontal d'un individu porteur de T21

Après avoir étudié des modèles cellulaires périphériques et un système neuronal *in vitro*, nous avons étudié la morphologie des EP dans les neurones du cortex préfrontal du cerveau *post-mortem* d'un individu porteur de la T21 (fourni par Peter De Deyn et Debby Van Dam, Anvers, Belgique). Afin d'analyser la morphologie des EP élargis observés dans ce type de neurones dans la littérature (Cataldo et al., 2000), nous avons observé un marquage immunohistologique fluorescent de Rab5 au microscope SR-SIM. Sur la figure 28, on peut observer à gauche un neurone de cortex préfrontal d'un individu porteur de T21, dont on distingue le soma grâce au bruit de fond dû à l'autofluorescence de la lipofuscine (granules de matériel non-digéré s'accumulant dans les lysosomes de neurones âgés). On peut néanmoins identifier des points lumineux de plus forte intensité correspondant au marquage Rab5. En microscopie à champ large, on peut observer un endosome précoce Rab5-positif, agrandi dans l'encart. La résolution de l'image de SR-SIM (droite) permet de distinguer cinq EP dans ce qui apparaît comme un seul endosome précoce en résolution classique. A nouveau, cet exemple montre que les EP sont de taille normale dans la T21, mais qu'ils ont tendance à s'agréger. De plus, la reconstruction informatique des images super-résolues élimine l'autofluorescence due à la lipofuscine, permettant ainsi de filtrer uniquement le signal provenant des EP. Cet aspect du SR-SIM est particulièrement intéressant car l'autofluorescence de la lipofuscine empêche généralement l'utilisation de la microscopie de fluorescence sur le tissu humain.

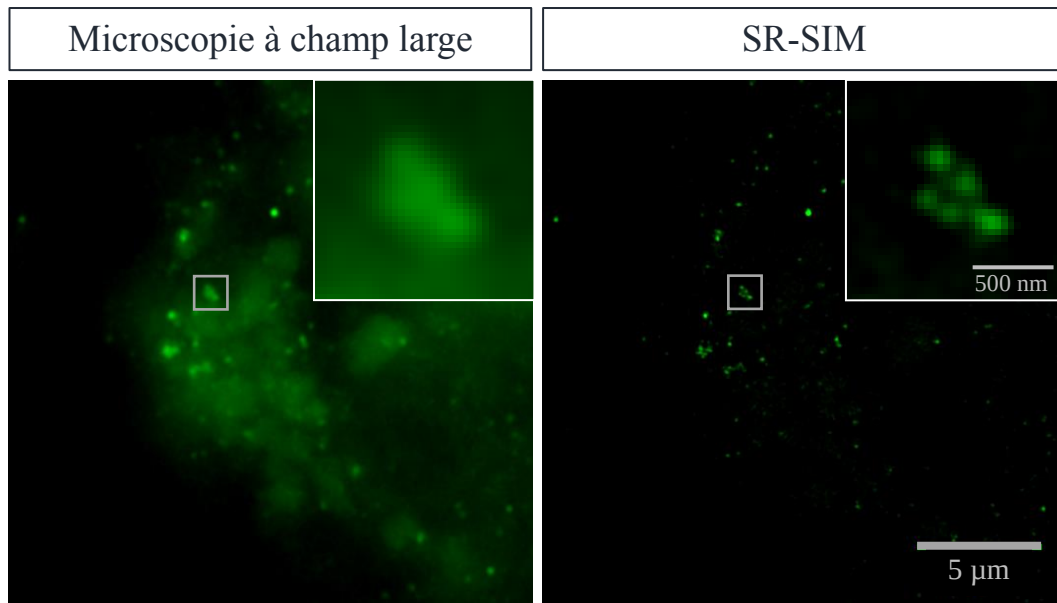


Figure 28. Microscopie super-résolutive par illumination structurée (SR-SIM) dans des neurones de cortex préfrontal provenant d'un individu porteur de T21

Les endosomes précoces de grande taille marqués par un anticorps anti-Rab5 dans l'image de fluorescence à champ large (gauche) correspondent à des agrégats d'endosomes de taille normale dans l'image super-résolue (droite). L'auto fluorescence de la lipofuscine (grains diffus) visible en fluorescence à champ large est filtrée par la reconstruction de l'image super-résolue de SIM.

1.6 Conclusion

Nos résultats montrent qu'en microscopie confocale, les EP ont une taille significativement augmentée dans les modèles que nous avons étudiés. La microscopie électronique et la microscopie SR-SIM révèlent qu'en réalité, les EP sont de taille normale mais qu'ils sont plus nombreux et ont tendance à s'agréger. La limite de résolution de la microscopie confocale ne permet pas de distinguer les agrégats d'EP.

2. Etude dynamique de la voie endosomale dans la trisomie 21

Objectif : Dans la première partie de la thèse, nous avons mis en évidence une augmentation du nombre d'EP de taille normale associée à une agrégation occasionnelle dans la T21. Cette partie était basée sur l'étude morphologique des EP dans des systèmes fixés (chimiquement ou physiquement), or la voie endosomale est un système très dynamique. Dans la deuxième partie de la thèse, nous nous sommes intéressés à la dynamique des différentes voies d'entrée et sortie des EP dans la T21.

2.1 Dynamique d'internalisation de la transferrine

Tout d'abord, nous nous sommes intéressés à la dynamique de l'endocytose. L'endocytose de phase fluide avait été observée à l'aide de HRP par l'équipe de Ralph Nixon (Cataldo et al., 2008). Dans notre étude, nous nous sommes concentrés sur l'endocytose de récepteur clathrine-dépendante. Pour cela, nous avons utilisé un outil classique d'étude de l'endocytose clathrine-dépendante : la transferrine. Couplée à un fluorochrome, on peut mesurer la quantité de transferrine fluorescente internalisée par la cellule et en déduire la dynamique d'endocytose clathrine-dépendante. Nous avons fait internaliser de la transferrine fluorescente par des fibroblastes euploïdes et T21, puis nous avons mesuré l'intensité de fluorescence dans les cellules par cytométrie en flux. Le temps d'internalisation de 4 minutes permet à la transferrine d'être endocytée mais limite son recyclage. Sur la figure 29a, on voit un exemple de distribution de fibroblastes euploïdes et T21 en fonction de l'intensité de fluorescence de chaque cellule. On peut observer que les fibroblastes T21 ont une distribution décalée vers les intensités de fluorescence plus élevées que les fibroblastes euploïdes. En figure 29b, les intensités moyennes de fluorescence sont représentées par lignée et par réplicat d'expérience. Une variabilité importante entre les lignées et entre les expériences est à noter. Une fois moyennée par expérience et par génotype (figure 29c), l'intensité moyenne de transferrine n'est pas significativement différente entre les fibroblastes euploïdes ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 3970, SEM $\pm$ 283,3) et les fibroblastes T21 ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 4248, SEM $\pm$ 405,5) (test de Mann-Whitney, p -value = 0,5346) (figure 29c).

Afin de confirmer ce résultat, nous avons réalisé une expérience d'internalisation de transferrine suivie d'une observation au microscopie confocal (figure 29d, e). L'observation de l'internalisation de la transferrine par microscopie confocale correspond à une seule expérience. A nouveau, on note une variabilité importante entre les cellules (figure 29d). En moyenne, il n'y a pas de différence significative entre l'intensité de fluorescence de la transferrine entre les fibroblastes euploïdes ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 271,9, SEM $\pm$ 45,03) et les fibroblastes T21 ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 234,1, SEM $\pm$ 22,92) (test de Mann-Whitney, p -value = 0,7) (figure 29e). Nous n'observons donc pas de différence d'endocytose de la transferrine entre les fibroblastes euploïdes et T21.

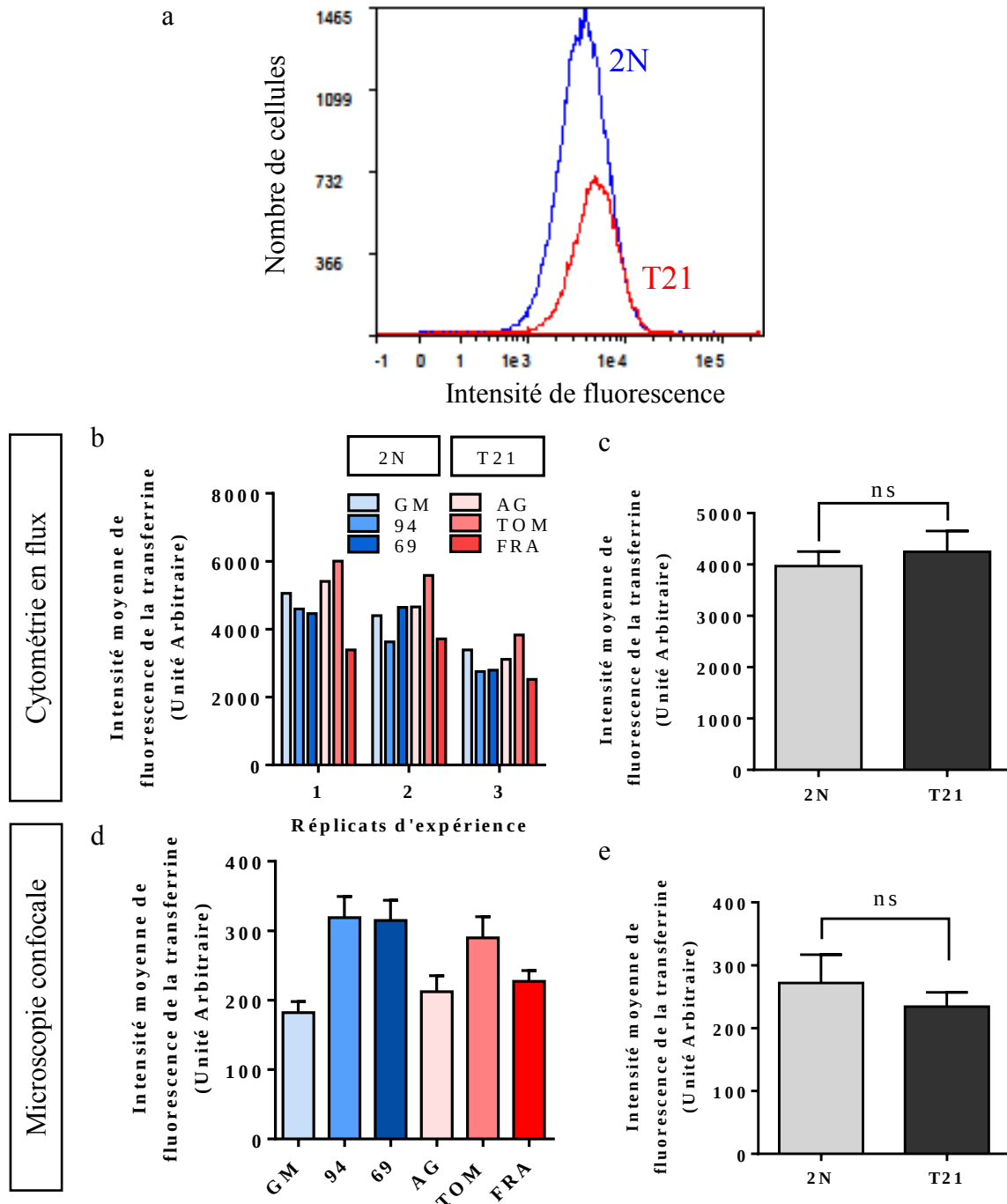


Figure 29. Endocytose de la transferrine mesurée par cytométrie en flux et microscopie confocale

a. Exemple de distribution des fibroblastes en fonction de l'intensité de fluorescence de la transferrine internalisée (unité arbitraire) mesurée par cytométrie en flux. La distribution euploïde provient de la lignée « 94 » (moyenne d'intensité de transferrine = 4481,73) et la distribution T21 provient de la lignée « TOM » (moyenne d'intensité de transferrine = 5850,52) b. Intensité moyenne de fluorescence de la transferrine mesurée par cytométrie en flux dans chaque lignée euploïde (bleu) et T21 (rouge) et par réplicat d'expérience. On observe une variabilité importante entre les lignées et entre les expériences c. Moyenne de l'intensité de transferrine, sans différence significative entre les fibroblastes euploïdes et T21 (intensité moyenne $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, p-value = 0,5346) d. Moyenne par lignée de l'intensité de fluorescence de la transferrine mesurée sur des images de microscopie confocale (une seule expérience) d. En moyenne sur cette expérience, l'intensité de fluorescence de la transferrine mesurée par microscopie confocale n'est pas significativement différente entre fibroblastes euploïdes et T21 (intensité moyenne $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, p-value = 0,7). Ns : non-significatif.

2.2 Recyclage du récepteur à la transferrine

Après avoir été internalisé (avec ou sans ligand), le récepteur à la transferrine est recyclé vers la membrane plasmique. Pour cela, il emprunte la voie de recyclage rapide ($t_{1/2} \approx 2$ minutes) et la voie de recyclage lente ($t_{1/2} \approx 12$ minutes) (Maxfield and McGraw, 2004). Dans notre expérience, les fibroblastes sont incubés avec la transferrine pendant 15 minutes puis sont fixés. Nous avons ensuite observé les récepteurs à la transferrine redirigés vers la membrane plasmique en réalisant un immunomarquage des récepteurs sans étape de perméabilisation. L'intensité de fluorescence du marquage reflète donc la quantité de récepteurs recyclés à la membrane plasmique. Nous avons tout d'abord contrôlé l'intensité de fluorescence du récepteur à la transferrine de surface en condition normale (cellules non traitées à la transferrine et n'ayant pas suivi le protocole de recyclage). Nous n'avons pas observé de différence d'intensité de fluorescence du récepteur entre les fibroblastes euploïdes ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 67,12, SEM $\pm$ 11,63) et les fibroblastes T21 ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 60,95, SEM $\pm$ 6,493) (test de Mann-Whitney, p -value = 0,9) (figure 30b). En situation stationnaire, on a donc la même quantité de récepteurs à la transferrine à la membrane plasmique dans les deux conditions.

Nous avons ensuite réalisé le protocole de recyclage sur ces fibroblastes (images représentatives en figure 30a). Nous avons mesuré une augmentation significative de l'intensité de fluorescence du récepteur à la transferrine dans les fibroblastes T21 ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 117,5, SEM $\pm$ 6,847) par rapport aux fibroblastes euploïdes ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 83,35, SEM $\pm$ 4,852) (test de Mann-Whitney, p -value = 0,0043) (figure 30c). En suivant le recyclage du récepteur à la transferrine, nous observons donc une augmentation de la quantité de récepteur recyclé à la membrane plasmique en condition T21.

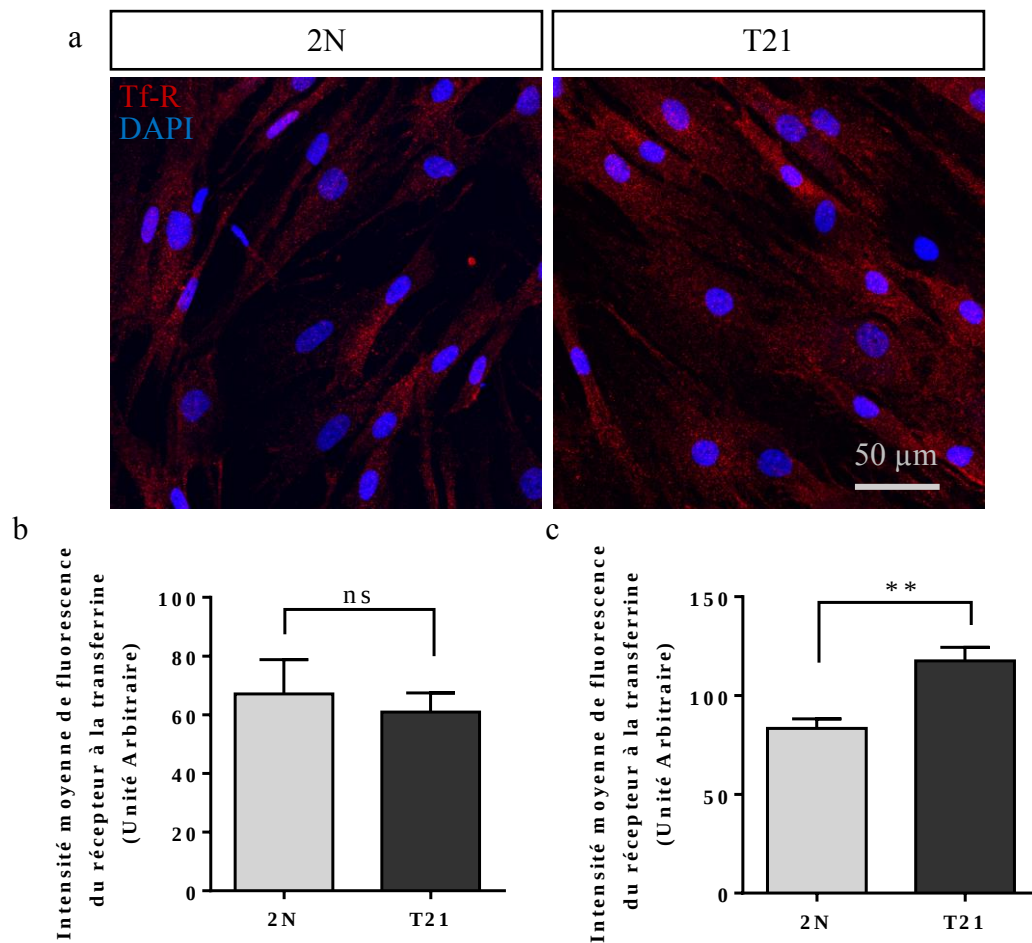


Figure 30. Recyclage du récepteur à la transferrine observé en microscopie confocale

a. Images représentatives du marquage en surface du récepteur à la transferrine dans une lignée de fibroblastes euploïdes (GM) et une lignée de fibroblastes T21 (FRA) b. Quantification de l'intensité de fluorescence du récepteur à la transferrine en condition normale. Il n'y a pas de différence d'intensité entre fibroblastes euploïdes et T21 (intensité de fluorescence $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, p-value = 0,9) c. Quantification de l'intensité de fluorescence du marquage du récepteur à la transferrine après traitement à la transferrine et expérience de recyclage, montrant une augmentation du signal en condition T21 (intensité de fluorescence $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, p-value = 0,0043). **p<0,01, ns : non-significatif.

2.3 Dégradation du récepteur à l'EGF

Après avoir analysé l'endocytose et le recyclage, nous avons étudié la voie de dégradation vers les lysosomes. Un outil classique d'étude de cette voie est la dégradation du récepteur à l'EGF. L'internalisation du récepteur à l'EGF est induite par la liaison d'un ligand, et la voie suivie par le récepteur dans la voie endo lysosomale dépend de la nature du ligand. Quand les cellules sont stimulées à l'EGF, le récepteur à l'EGF est internalisé puis dirigé vers les endosomes tardifs et

les lysosomes pour y être dégradé. Nous avons donc stimulé les fibroblastes euploïdes et T21 à l'EGF pendant des durées croissantes. De cette manière on peut suivre la dégradation du récepteur à l'EGF en mesurant le niveau du récepteur par western blot au cours du temps. Dans la figure 31a, on peut voir que le niveau du récepteur à l'EGF décroît au cours du temps dans les fibroblastes euploïdes et T21. Le niveau de protéine a été quantifié. D'abord, nous avons contrôlé que le niveau de récepteur à l'EGF est le même au temps 0 dans les fibroblastes euploïdes ($n = 3$ lignées, niveau d'EGF-R/GAPDH = 1,76, SEM $\pm 0,3814$) et T21 ($n = 3$ lignées, niveau d'EGF-R/GAPDH = 1,298, SEM $\pm 0,1577$) (test de Mann-Whitney, p -value = 0,4) (figure 31b). Dans la figure 31c, on peut voir que la cinétique de dégradation du récepteur à l'EGF est significativement retardée dans les fibroblastes T21 (ANOVA à deux facteurs, p -value du génotype = 0,0118). Une analyse *post-hoc* entre chaque génotype pour chaque temps (test de Sidak) montre que la différence est significative à partir de 60 minutes de traitement (test de Sidak, p -value < 0,05), puis à 90 minutes (test de Sidak, p -value < 0,01) et à 120 minutes (test de Sidak, p -value < 0,05). Cette expérience montre que la dégradation du récepteur à l'EGF est significativement retardée dans les fibroblastes T21 par rapport aux fibroblastes euploïdes.

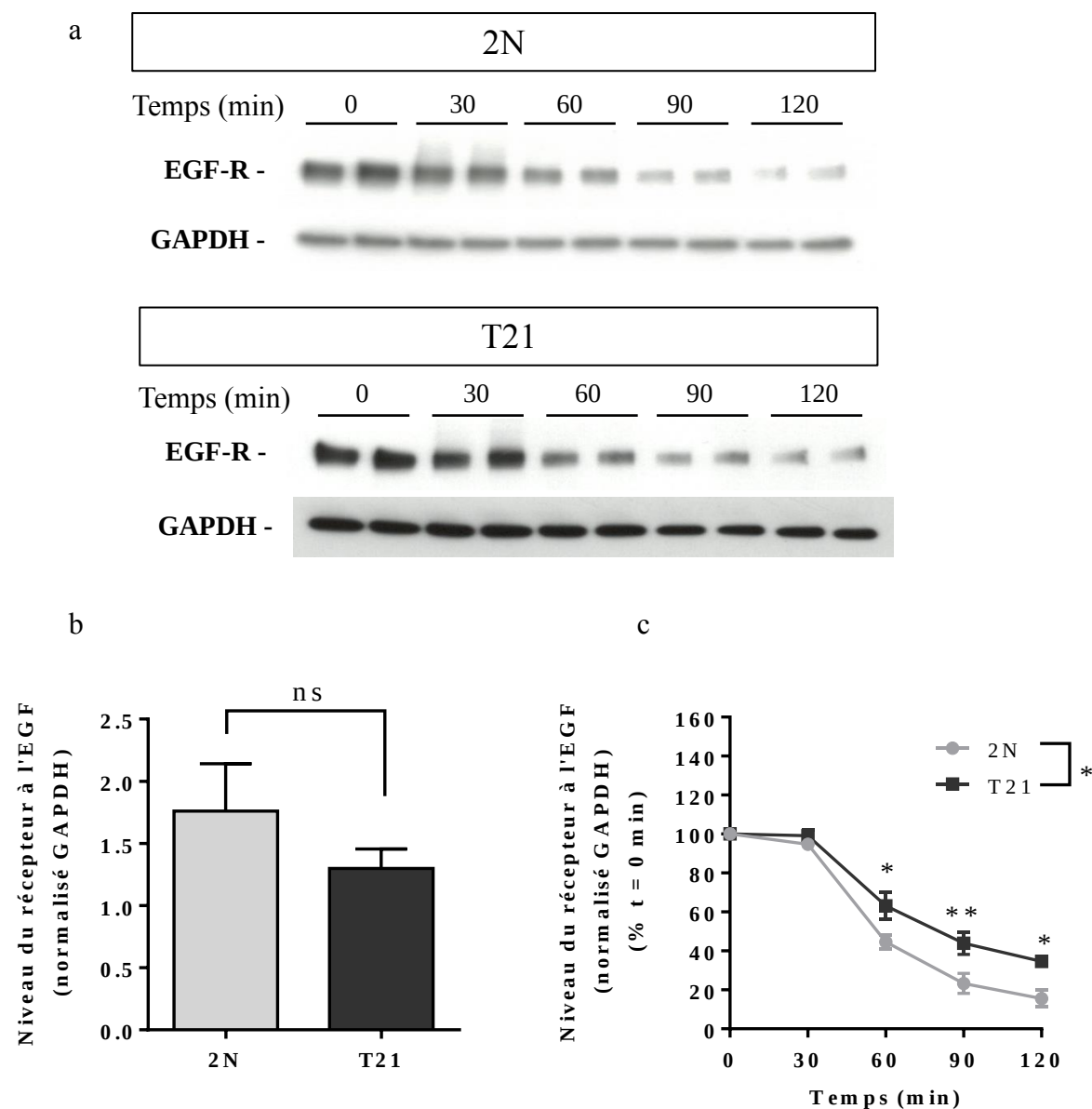


Figure 31. Cinétique de dégradation du récepteur à l'EGF

a. Western blots illustrant la dégradation du récepteur à l'EGF (EGF-R) mesurée toutes les 30 minutes sur une durée totale de traitement à l'EGF de 120 minutes dans des fibroblastes euploïdes et provenant d'individus porteurs de T21 b. Au temps 0, il n'y a pas de différence entre le niveau d'expression du récepteur à l'EGF entre les fibroblastes euploïdes et les fibroblastes T21 (test de Mann-Whitney, p-value = 0,4) c. La quantification du niveau de protéine montre que la dégradation du récepteur à l'EGF est significativement retardée dans les fibroblastes T21 par rapport aux fibroblastes euploïdes (Niveau EGF-R/niveau GAPDH en % t = 0 min $\pm$ SEM, ANOVA à deux facteurs, p-value du génotype = 0,0118, test *post-hoc* de Sidak) *p<0,05, **p<0,01, ns : non-significatif.

2.4 Conclusion

Dans cette partie, nous avons étudié la dynamique de l'endocytose, du recyclage et de la dégradation dans des fibroblastes euploïdes et T21. Nos données ne suggèrent pas de différence de niveau d'internalisation de la transferrine en cytométrie en flux et en microscopie confocale. En revanche, nous montrons que le recyclage du récepteur à la transferrine est plus rapide et que la dégradation du récepteur à l'EGF est retardée dans les fibroblastes T21 par rapport aux fibroblastes euploïdes. Ces expériences mettent en évidence un déséquilibre de la dynamique de la voie endosomale et du tri des cargos en condition T21.

3. Anomalies moléculaires des endosomes précoces dans la trisomie 21

Objectif : La troisième partie du projet de thèse a pour objectif d'identifier des anomalies moléculaires des endosomes précoces dans la T21 et de comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des phénotypes morphologiques et dynamiques observés en partie 1 et 2. L'augmentation du nombre d'EP de taille normale que nous décrivons entre en contradiction avec les études mécanistiques portant sur la compréhension de l'élargissement des EP dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer publiées par d'autres équipes de recherche. Ces études se sont principalement intéressées à un déséquilibre de l'activité de Rab5. Cette petite GTPase intervient dans la fusion des EP (Stenmark et al., 1994). La surexpression d'APP, entraînant une augmentation de β -CTF, est suspectée d'être responsable du recrutement d'APPL1 qui stabiliserait la forme liée au GTP de Rab5 et promouvrait ainsi la fusion des EP (Kim et al., 2016). De plus, il est également proposé que l'augmentation d'APP et de β -CTF perturbe le transport axonal du NGF (neural growth factor) impliqué dans la dégénérescence des neurones cholinergiques du septum (Xu et al., 2016). Dans la première partie de mon projet de thèse, nous mettons en évidence un paradoxe entre la sur-activation de Rab5 et l'agrégation d'EP de taille normale dans la T21. L'ultrastructure des EP géants produits par la sur-activation de Rab5 est clairement différente de celle observée dans nos images de microscopie électronique dans la T21 (Wegner et al., 2010). Dans la deuxième partie de thèse, nous nous sommes intéressés à la dynamique de la voie endosomale dans des fibroblastes T21. Dans cette troisième partie, nous avons mesuré les niveaux de membres importants de la régulation des EP et testé une hypothèse alternative pour restaurer les phénotypes que nous observons.

3.1 Niveaux de membres régulateurs des endosomes précoces

3.1.1 Niveaux de Rab5 et EEA1

Afin d'analyser les anomalies des EP à l'échelle moléculaire, nous avons mesuré le niveau de protéines et lipides intervenant dans la régulation des EP. Nous avons d'abord étudié les niveaux de Rab5 total dans notre collection de fibroblastes euploïdes et T21 par western blot. Le niveau de Rab5 est significativement diminué dans les fibroblastes T21 (3 expériences indépendantes, niveau de Rab5/GAPDH/2N = 0,7308, SEM $\pm$ 0,0876) par rapport aux fibroblastes euploïdes (niveau de Rab5/GAPDH = 1, SEM $\pm$ 0,0823) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,0397) (figure 32a).

Nous avons également mesuré le niveau d'EEA1 dans les fibroblastes euploïdes et T21. EEA1 est un effecteur de Rab5 dont la fonction d'ancrage précède la fusion endosomale. L'augmentation du nombre d'EP de taille normale observée en microscopie électronique après congélation à haute pression pourrait être due à une anomalie de ce facteur d'ancrage. Le niveau d'EEA1 est significativement augmenté dans les fibroblastes T21 (3 expériences indépendantes, niveau de EEA1/protéines totales/2N = 1,219, SEM $\pm$ 0,0505) par rapport aux fibroblastes euploïdes (niveau de EEA1/protéines totales/2N = 1, SEM $\pm$ 0,0328) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,0029) (figure 32b). Dans cette expérience, le niveau d'EEA1 a été normalisé avec le niveau de protéines totales mesuré à partir d'une coloration des membranes au rouge Ponceau. Ces résultats montrent une diminution du niveau de Rab5 et une augmentation du niveau d'EEA1 en condition T21.

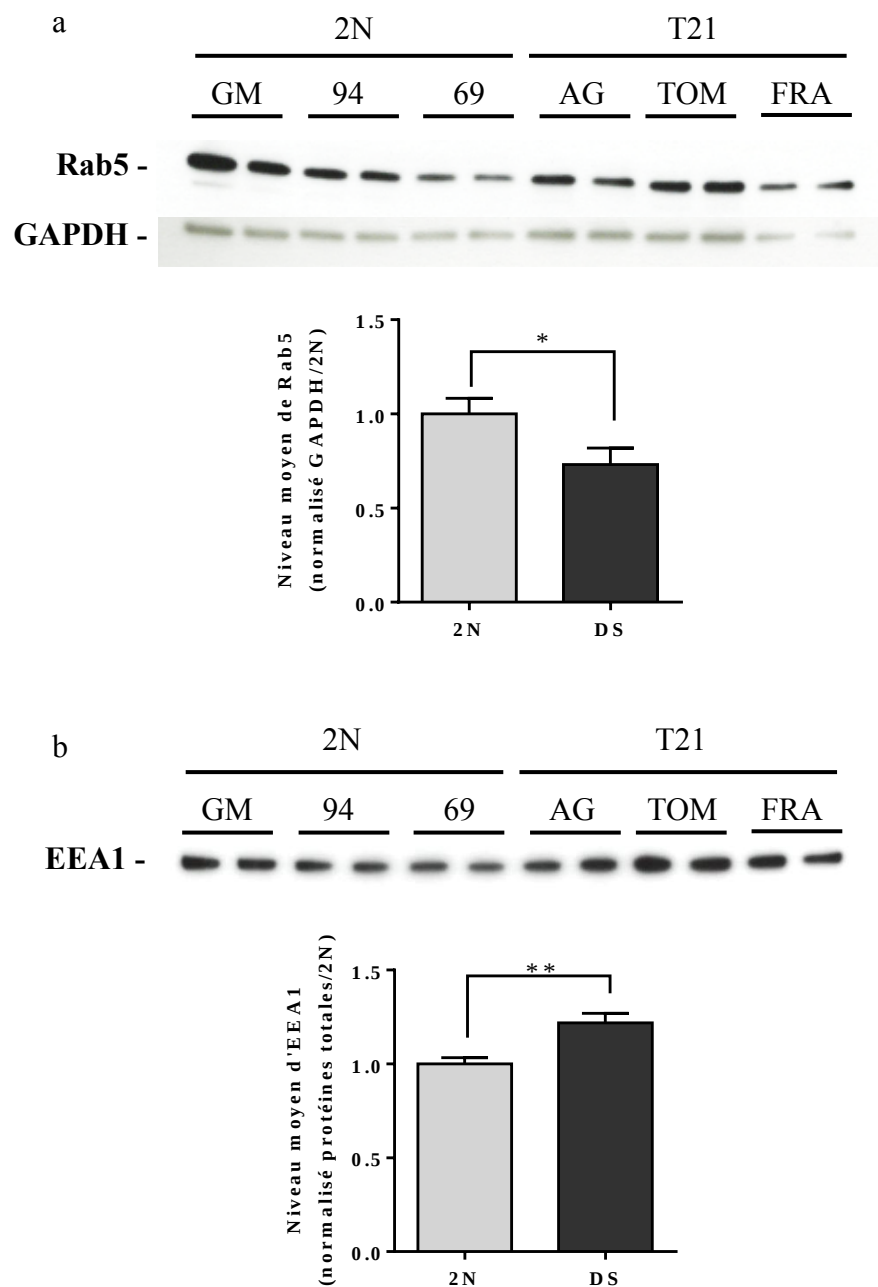


Figure 32. Niveaux de Rab5 et d'EEA1 par western blot

a. Image représentative d'un western blot de Rab5 et GAPDH (gène de ménage) dans des fibroblastes euploïdes et T21. La quantification révèle une diminution significative du niveau de Rab5 dans les fibroblastes (niveau Rab5/niveau GAPDH/2N $\pm$ SEM, test de Mann Whitney, p-value = 0,0397)

b. Image représentative d'un western blot de EEA1 dans des fibroblastes euploïdes et T21. Le niveau d'EEA1 est significativement augmenté dans les fibroblastes T21 (niveau EEA1/protéines totales/2N $\pm$ SEM, test de Mann Whitney, p-value = 0,0029). *p<0,05, **p<0,01.

3.1.2 Niveau de PI(3)P

Avoir mesuré les niveaux de Rab5 et d'EEA1, nous avons étudié le niveau de PI(3)P dans nos fibroblastes euploïdes et T21. Ce phospholipide joue un rôle majeur dans la régulation des EP car il recrute de nombreux effecteurs, dont EEA1. Nous avons cherché à obtenir un marquage fluorescent du PI(3)P afin de le quantifier et d'en déduire la quantité de PI(3)P par cellule. Afin d'observer le PI(3)P par fluorescence, nous avons d'abord transfecté la sonde plasmidique 2XFYVE-GFP dans des fibroblastes et réalisé un co-marquage avec EEA1 pour observer la morphologie des EP (figure 33a). La sonde 2XFYVE se lie spécifiquement au PI(3)P (Gillooly et al., 2000). On peut observer que l'expression du plasmide codant la sonde 2XFYVE-GFP varie de manière importante d'une cellule à l'autre, rendant impossible la quantification du niveau de PI(3)P sur la base du niveau de fluorescence de la sonde. De plus, une forte expression (fibroblaste euploïde #2, figure 33a) induit une augmentation de la taille des EP EEA1-positifs par rapport à une expression faible (fibroblaste euploïde #1, figure 33a). Cet effet est certainement dû à une séquestration du PI(3)P à la membrane des EP par la sonde, stabilisant les effecteurs de fusion tel qu'EEA1. Cet outil n'est donc pas indiqué pour mesurer la quantité de PI(3)P dans nos fibroblastes euploïdes et T21.

Après ces observations, la stratégie a été de réaliser un marquage du PI(3)P après avoir fixé les cellules afin de ne pas modifier l'équilibre des effecteurs à la surface des EP. La sonde 2XFYVE existe également sous forme protéique (couplée à un *tag* comme la GST) et peut être utilisée comme un anticorps pour détecter le PI(3)P après fixation des cellules. Il existe également un anticorps commercial anti-PI(3)P (Echelon). Nous avons souhaité réaliser des marquages de PI(3)P à l'aide de cet anticorps. Afin de s'assurer de la spécificité de l'anticorps, nous avons réalisé un co-marquage avec la sonde 2XFYVE-GST sous sa forme protéique. Cette expérience a été réalisée en collaboration avec Etienne Morel (Institut Necker). Dans la figure 33b, on peut observer le co-marquage entre l'anticorps et la sonde. La grande majorité des structures marquées par l'anticorps sont également marquées par la sonde. La sonde semble marquer un plus grand nombre de structure par rapport à l'anticorps, certainement grâce à sa haute spécificité. La colocalisation entre les deux marquages indique que la spécificité de l'anticorps est suffisante pour qu'il soit utilisé afin de détecter le PI(3)P.

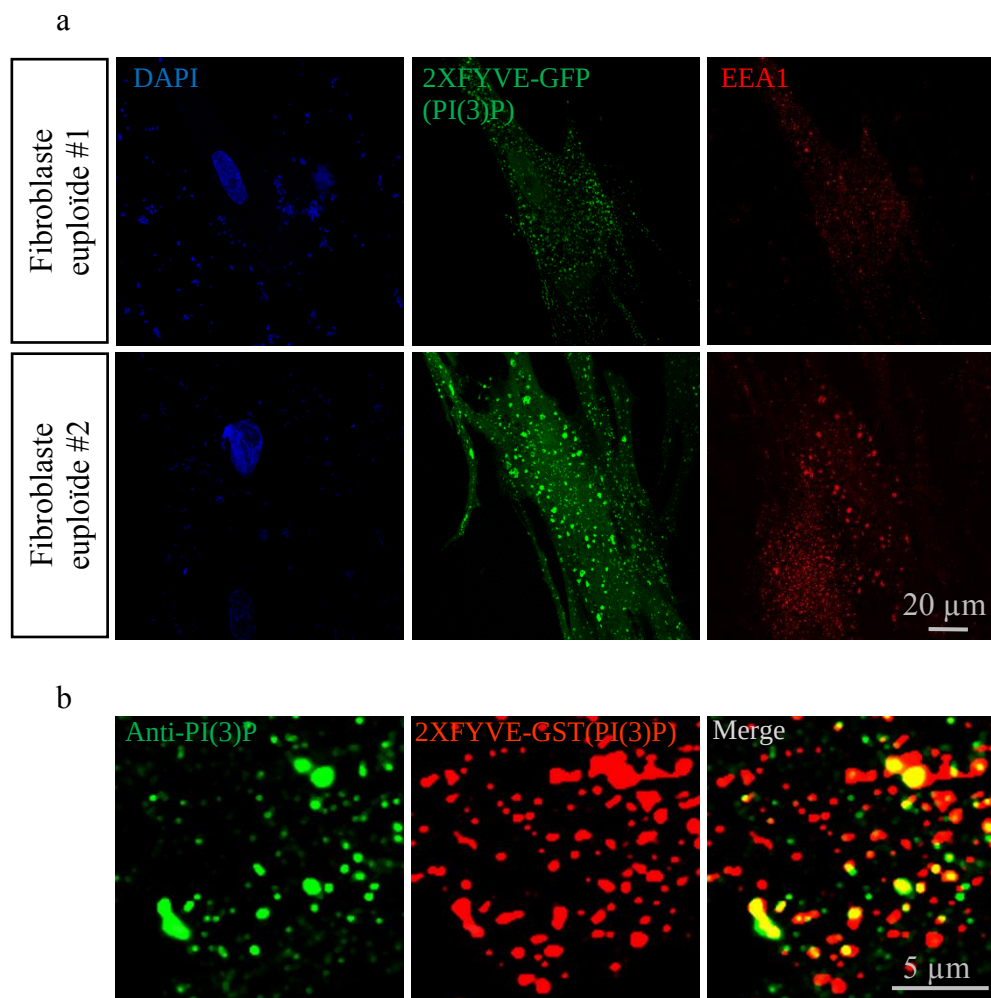


Figure 33. Tests de détection du PI(3)P en fluorescence

a. Images illustrant une transfection de la sonde plasmidique 2XFYVE-GFP et un marquage EEA1 dans des fibroblastes euploïdes. L'expression de la sonde varie de manière importante entre les cellules (faible dans le fibroblaste #1, forte dans le fibroblaste #2), modifiant le fonctionnement des endosomes précoces b. Images montrant les marquages obtenus avec un anticorps anti-PI(3)P (vert) et avec la sonde protéique 2XFYVE-GST révélée par un immunomarquage anti-GST (rouge). La superposition des signaux (Merge) fait apparaître la colocalisation des signaux en jaune.

Nous avons donc réalisé un immunomarquage de nos fibroblastes euploïdes et T21 avec l'anticorps anti-PI(3)P décrit ci-dessus. L'intensité de fluorescence a donc pu être mesurée dans chaque fibroblaste dans les deux conditions. Des images représentatives sont présentées en figure 34a. L'intensité moyenne de fluorescence du PI(3)P est significativement diminuée dans les fibroblastes T21 ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 199,9, SEM $\pm$ 4,283) par rapport aux fibroblastes euploïdes ($n = 3$ lignées, intensité moyenne de fluorescence = 225,2, SEM $\pm$ 7,333) (ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value du génotype = 0,0433) (figure 34b).

Nous avons voulu déterminer si la diminution du niveau de PI(3)P en condition T21 vient d'une diminution du niveau de la kinase qui le synthétise : Vps34. Nous avons donc mesuré le niveau

de Vps34 dans les deux conditions par western blot (figure 34c). Le niveau de Vps34 n'est pas modifié dans les fibroblastes T21 (niveau de Vps34/protéines totales/2N = 0,9127, SEM $\pm$ 0,0823) par rapport aux fibroblastes euploïdes (niveau de Vps34/protéines totales/2N = 1, SEM $\pm$ 0,0964) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,4037) (figure 34c). La diminution de la quantité de PI(3)P n'est donc pas due à un défaut du niveau de Vps34.

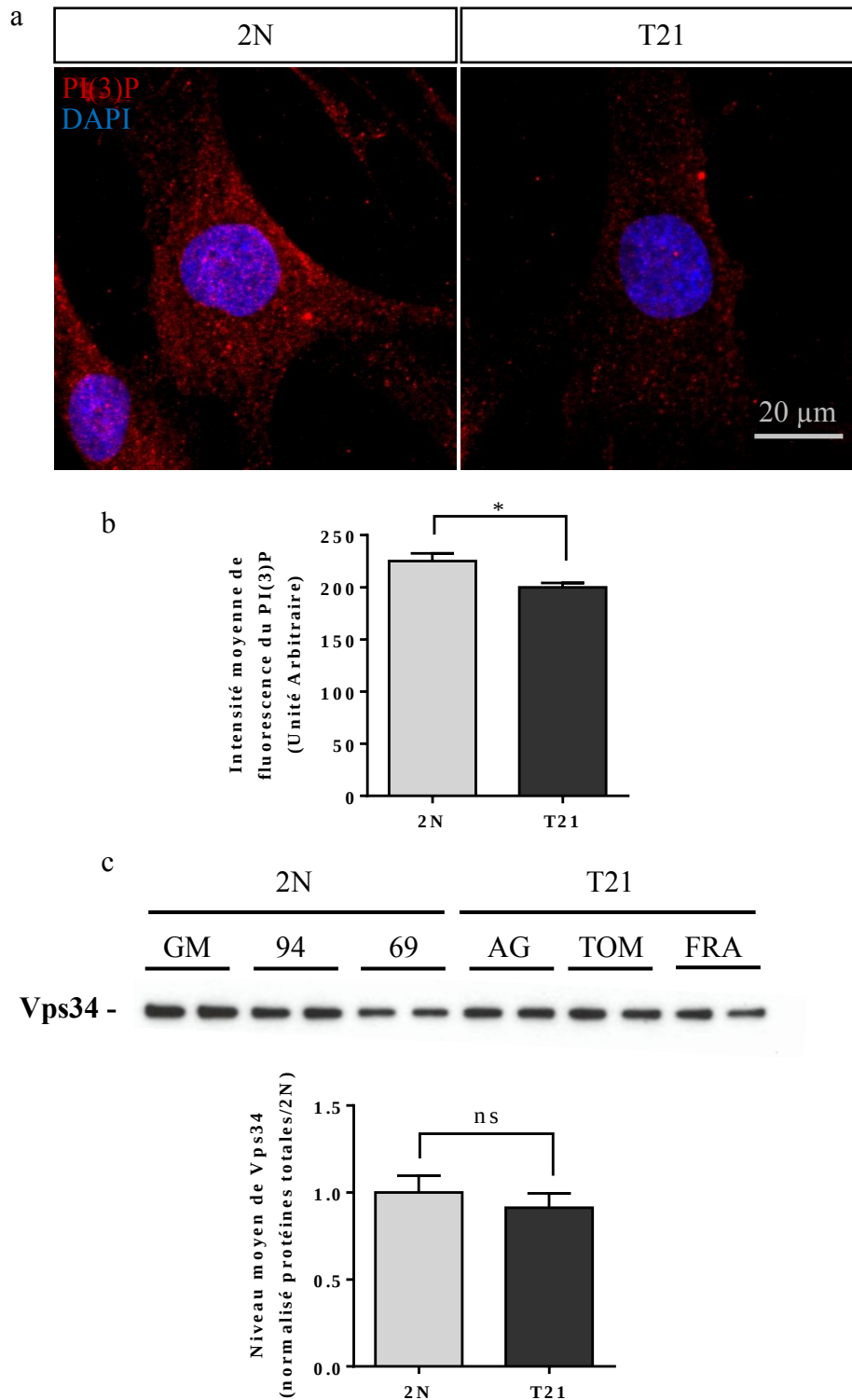


Figure 34. Marquage du PI(3)P et niveau de Vps34

a. Images représentatives d'un marquage à l'aide d'un anticorps anti-PI(3)P dans des fibroblastes euploïdes et T21 b. La quantification de l'intensité du signal PI(3)P montre une augmentation significative de l'intensité de fluorescence dans les fibroblastes T21 par rapport aux fibroblastes euploïdes (intensité moyenne de fluorescence $\pm$ SEM, ANOVA hiérarchisée à effets mixtes, p-value = 0,0433) c. Western blot illustrant le niveau de Vps34, non modifié entre fibroblastes euploïdes et T21 (niveau Vps34/protéines totales/2N $\pm$ SEM, test de Mann Whitney, p-value = 0,4037) *p<0,05, ns : non-significatif.

3.2 Etude de l'effet d'un inhibiteur de PIKfyve dans des fibroblastes T21

3.2.1 Niveau d'EEA1 après traitement des fibroblastes à l'inhibiteur de PIKfyve

Afin de comprendre pourquoi le niveau de PI(3)P est diminué dans la T21, nous avons recherché un lien entre les gènes surexprimés dans la T21 et les membres de la voie de synthèse et de conversion du PI(3)P. Dans ce cadre, une étude a montré que l'APP peut lier la kinase PIKfyve et en modifier l'activité (Currinn et al., 2016)). PIKfyve est une kinase dont l'association avec des protéines régulatrices forme le complexe de conversion du PI(3)P en PI(3,5)P₂. La surexpression d'APP pourrait donc expliquer le défaut de PI(3)P que nous observons. Le PI(3,5)P₂ est un phospholipide pour lequel il n'y a pas de sonde spécifique, nous ne pouvons donc pas l'observer comme nous l'avons fait pour le PI(3)P. Nous avons directement utilisé un inhibiteur de PIKfyve afin de savoir s'il améliore les phénotypes observés en condition T21.

Dans la figure 35a, des western blots illustrent le niveau d'EEA1 après traitement au DMSO ou au YM201636 dans les fibroblastes euploïdes et T21. Les résultats des quantifications du niveau d'EEA1 sont présentés de deux manières. En figure 35b, tous les niveaux de protéines des réplicats d'expérience ont été rapportés à la quantité de protéine moyenne dans les fibroblastes euploïdes traités au DMSO. On obtient un effet significatif du facteur traitement sur la diminution du niveau moyen d'EEA1 (ANOVA à deux facteurs, p-value du traitement = 0,0448). L'effet génotype n'est pas significatif (p-value du génotype = 0,1281). Le test *post-hoc* entre tous les groupes ne révèle pas de différences après comparaisons multiples (test de Tukey). En figure 35c et d, les niveaux moyens d'EEA1 ont été rapportés au niveau moyen des fibroblastes traités DMSO au sein de chaque génotype. Dans les fibroblastes euploïdes (figure 35c), il n'y a pas de différence significative entre le niveau moyen d'EEA1 dans les fibroblastes traités au DMSO (niveau d'EEA1/GAPDH/DMSO = 1, SEM $\pm$ 0,1094) ou au YM201636 (niveau d'EEA1/GAPDH/DMSO = 0,9004, SEM $\pm$ 0,1222) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,7137). Dans les fibroblastes T21 (figure 35d), le niveau moyen d'EEA1 est significativement diminué dans les fibroblastes traités au YM201636 (niveau d'EEA1/GAPDH/DMSO = 0,6378, SEM $\pm$ 0,0993) par rapport aux fibroblastes traités au

DMSO (niveau d'EEA1/GAPDH/DMSO = 1, SEM $\pm$ 0,0709) (test de Mann-Whitney, p-value = 0,0142). On peut conclure que le traitement des fibroblastes au YM201636 a pour effet de diminuer significativement le niveau d'EEA1 dans les fibroblastes T21. On note également une tendance à la diminution dans les fibroblastes euploïdes.

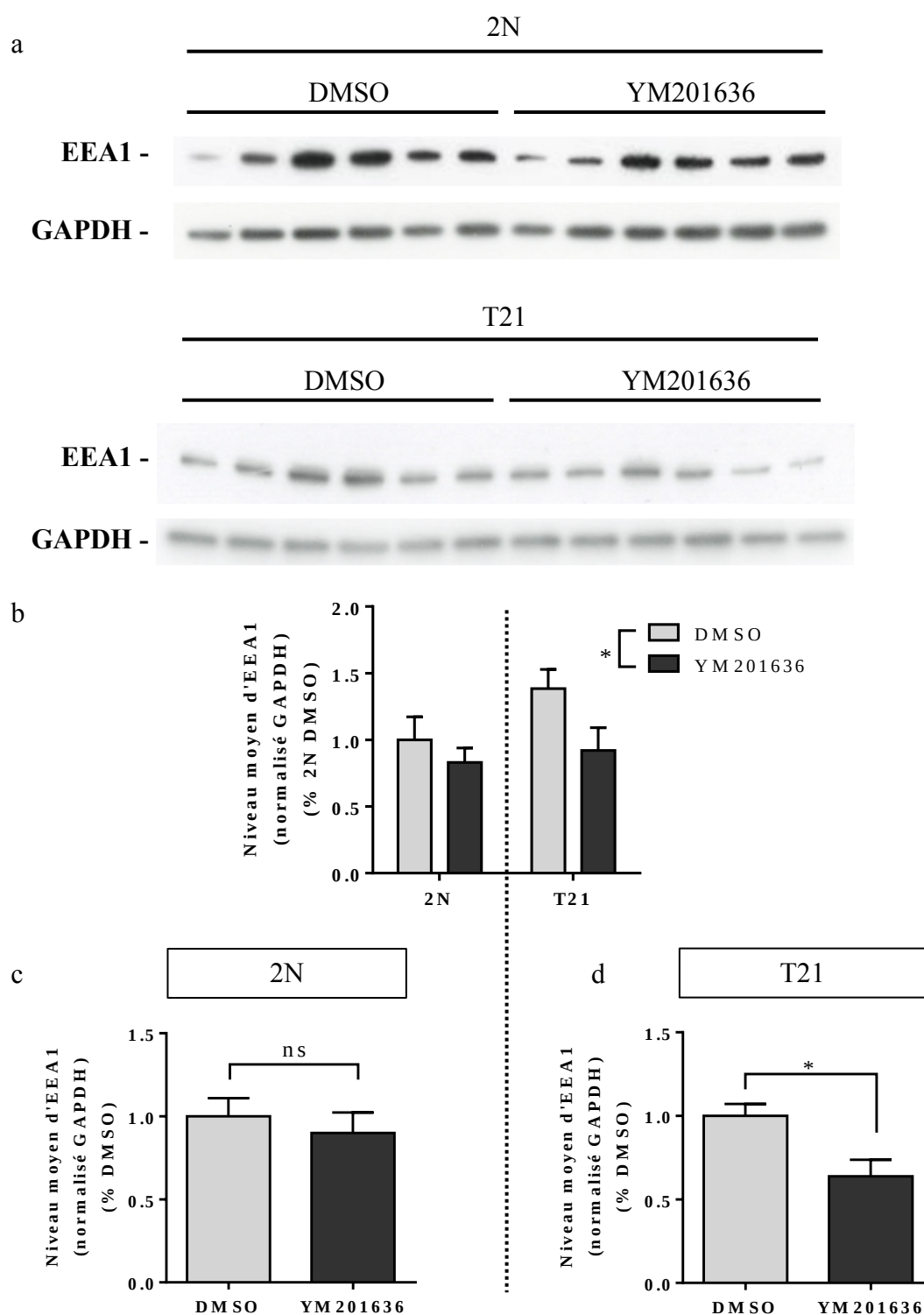


Figure 35. Niveau d'EEA1 après traitement au YM201636

a. Western blots illustrant le niveau d'EEA1 dans les fibroblastes euploïdes et T21 après traitement au DMSO ou au YM201636 b. La quantification montre un effet significatif du traitement sur le niveau d'EEA1 (niveau EEA1/niveau GAPDH/2N DMSO $\pm$ SEM, ANOVA à deux facteurs, p-value du traitement = 0,0448) c. En condition 2N, il n'y a pas de différence significative du niveau d'EEA1 lorsque l'on compare les fibroblastes traités au DMSO ou au YM201636 (niveau EEA1/niveau GAPDH/DMSO $\pm$ SEM, test de Mann Whitney, p-value = 0,7137) d. En condition T21, le niveau d'EEA1 est significativement diminué dans les fibroblastes traités au YM201636 dont la moyenne a été rapportée aux fibroblastes T21 traités au DMSO (niveau EEA1/niveau GAPDH/DMSO $\pm$ SEM, test de Mann Whitney, p-value = 0,0142) *p<0,05, ns : non-significatif.

3.2.2 Production d'Aβ après traitement des fibroblastes à l'inhibiteur de PIKfyve

Nous avons montré que l'inhibition de PIKfyve avec le YM201636 restaure le niveau d'EEA1 dans les fibroblastes T21. Nous avons ensuite voulu déterminer si l'inhibition de YM201636 permet également de réduire la production d'Aβ, car ce phénotype a des implications pathologiques majeures dans la T21 et la maladie d'Alzheimer. Nous avons traité les fibroblastes euploïdes et T21 avec du DMSO ou l'inhibiteur YM201636 pendant 24 heures, et nous avons dosé la quantité d'Aβ₄₀ et d'Aβ₄₂ sécrétée par les cellules. En figure 36a, on peut observer un effet significatif du facteur traitement sur la diminution du niveau d'Aβ₄₀ (quantité moyenne en pg/mg de protéine/2N DMSO ± SEM, ANOVA à deux facteurs, p-value du traitement = 0,0270). L'effet génotype est également significatif (quantité moyenne en pg/mg de protéine/2N DMSO ± SEM, p-value du génotype = 0,0135). En figure 36b, la quantification du niveau d'Aβ₄₂ est présentée. Il n'y a pas d'effet significatif du traitement du génotype sur la

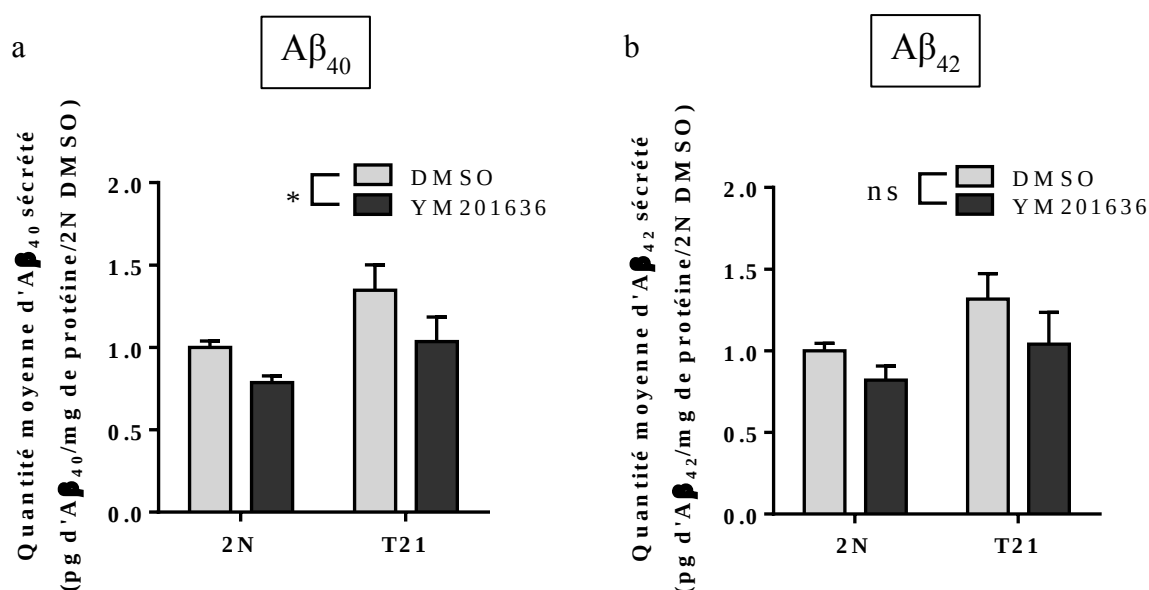


Figure 36. Quantité d'Aβ₄₀ et Aβ₄₂ sécrétés après traitement au YM201636

Les quantités d'Aβ₄₀ et d'Aβ₄₂ sécrétés par les fibroblastes euploïdes et T21 après traitement au DMSO ou au YM201636 ont été dosées a. Le génotype et le traitement ont un effet significatif sur la production d'Aβ₄₀ dans les fibroblastes euploïdes et T21 (quantité moyenne en pg/mg de protéine/2N DMSO ± SEM, ANOVA à deux facteurs, p-value du génotype = 0,0135, p-value du traitement = 0,027) b. Le génotype et le traitement n'ont pas d'effet significatif sur la production d'Aβ₄₂ dans les fibroblastes euploïdes et T21 (quantité moyenne en pg/mg de protéine/2N DMSO ± SEM, ANOVA à deux facteurs, p-value du génotype = 0,0585, p-value du traitement = 0,1042). *p<0,05, ns : non-significatif.

quantité d'A β ₄₂ (quantité moyenne en pg/mg de protéine/2N DMSO $\pm$ SEM, ANOVA à deux facteurs, p-value du traitement = 0,1042, p-value du génotype = 0,0585), malgré une tendance similaire aux résultats observés pour les quantités d'A β ₄₀. L'A β ₃₈ n'a pas été mesuré car les quantités d'A β ₃₈ étaient sous le seuil de détection. Ces résultats montrent que l'inhibition de PIKfyve permet de diminuer la quantité d'A β sécrétée par les fibroblastes T21.

3.2.3 Effet de l'inhibition de PIKfyve sur la morphologie des endosomes précoces

Après avoir montré que l'inhibition de PIKfyve avec le YM201636 restaure les niveaux d'EEA1 et d'A β sécrété, nous avons observé la morphologie des EP après traitement à l'inhibiteur. En figure 37, on peut voir que un marquage EEA1 dans des fibroblastes traités au DMSO ou au YM201636. Les EP EEA1-positifs apparaissent plus grands dans la cellule traitée au YM201636 que dans la condition DMSO. Dans la cellule traitée au YM201636, on distingue les domaines EEA1-positifs à la membrane des endosomes précoce. Cet aspect rend la quantification de la taille et du nombre d'EP impossible avec la méthode de détection des vésicules utilisée dans la partie 1.

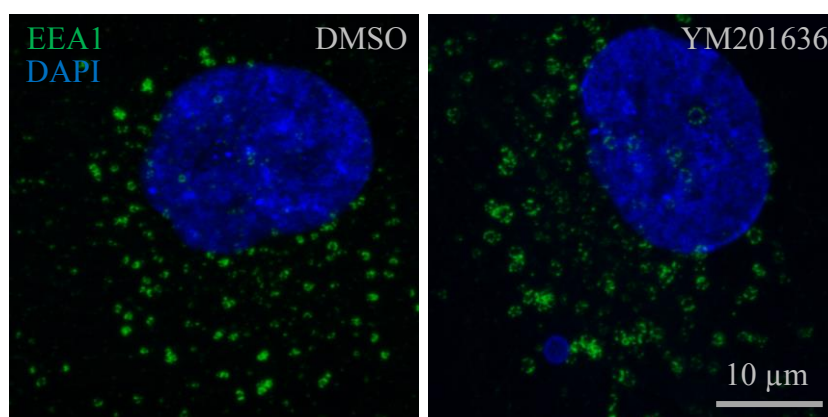


Figure 37. Marquage EEA1 après traitement au YM201636

Images représentatives d'un marquage EEA1 dans des fibroblastes T21 (TOM) après un traitement au DMSO (gauche) ou au YM201636 (droite). Les endosomes précoces EEA1-positifs apparaissent plus grands dans la condition traitée au YM201636. Le marquage ponctiforme correspond aux domaines EEA1 à la membrane limitante des endosomes.

3.3 Conclusion

Dans cette partie, nous montrons que le niveau d'EEA1 est augmenté alors que les niveaux de Rab5 et de PI(3)P sont diminués dans les fibroblastes T21. La diminution du PI(3)P n'est pas due à une anomalie du niveau de Vps34. L'inhibition de PIKfyve qui convertit le PI(3)P en PI(3,5)P₂ permet de restaurer le niveau d'EEA1 et la quantité d'Aβ sécrété dans les fibroblastes T21. Enfin, l'inhibiteur de PIKfyve a pour effet d'augmenter la taille des EP.

DISCUSSION

1. Discussion de la partie 1 des résultats :

caractérisation morphologique des endosomes précoces dans la trisomie 21

L'objectif de cette partie était de caractériser la morphologie des endosomes précoces par des techniques de microscopie avancées dans différents modèles de la trisomie 21. D'abord, nous avons étudié la morphologie des endosomes précoces en microscopie électronique après fixation chimique dans deux modèles cellulaires périphériques humains de la trisomie 21 : les LCL et les fibroblastes. Dans ces deux types cellulaires, la microscopie électronique après fixation chimique a révélé que les endosomes précoces élargis observés auparavant dans ces modèles correspondent à des endosomes précoces de taille normale ayant tendance à s'agréger. Le phénomène d'agrégation des endosomes précoces semble plus marqué dans les fibroblastes que dans les LCL. Dans les LCL, les endosomes précoces apparaissent nombreux sur une surface restreinte, sans être réellement accolés. Le nombre d'endosomes précoces n'a pas été quantifié dans ce type cellulaire. Dans les fibroblastes, les endosomes précoces sont plus proches les uns des autres.

Afin d'éliminer toute observation artéfactuelle due à la fixation chimique des cellules, nous avons réalisé une expérience de microscopie électronique après fixation à haute pression dans des fibroblastes. Dans cette expérience, nous avons rarement observé des agrégats d'endosomes précoces semblables à ceux observés après fixation chimique des échantillons dans les fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21. Les quantifications révèlent une augmentation du nombre d'endosomes précoces alors que leur surface individuelle n'est pas modifiée. L'augmentation du nombre d'endosomes précoces augmente la probabilité de les observer regroupés ou proches. En effet, bien qu'ils soient rarement accolés, les endosomes précoces apparaissent plus proches que dans les fibroblastes euploïdes. Ainsi, l'agrégation observée après fixation chimique est plus vraisemblablement due à une augmentation du nombre d'endosomes qu'à un phénomène pathologique d'agrégation. On observe donc une augmentation du nombre d'endosomes précoces, dont l'agrégation observée en figures 20 et 21 est favorisée par la fixation chimique. Une expérience de microscopie électronique après

fixation chimique et après congélation à haute-pressure menée en parallèle sur les mêmes cultures de cellules serait nécessaire pour statuer sur cette hypothèse. Dans tous les cas, nos expériences de microscopie électronique montrent que le phénotype d'endosomes précoces élargis décrit auparavant dans les LCL et les fibroblastes n'est pas retrouvé à haute résolution. L'élargissement des endosomes précoces en condition trisomie 21 observé en microscopie optique classique (type confocale) est donc dû à une augmentation du nombre d'endosomes précoces de taille normale. Cette augmentation du nombre d'endosomes précoces favorise l'observation d'agrégats, apparaissant comme des endosomes élargis à faible résolution.

Le modèle Ts65Dn a été largement étudié dans la trisomie 21 et notamment dans l'étude des anomalies endosomales. Nous avons étudié les BFCN du MSN de cette souris car cette population neuronale est susceptible à la neurodégénération dans la trisomie 21 et la maladie d'Alzheimer. Comme rapporté dans la littérature (Cataldo et al., 2003, Xu et al., 2016), les endosomes précoces ont une surface significativement augmentée dans les BFCN de souris Ts65Dn par rapport aux souris WT en microscopie confocale. Cette tendance, bien que non-significative, se retrouve dans les autres types neuronaux que nous avons étudiés. Nous n'avons pas pu mesurer la taille des endosomes précoces en 3 dimensions car nous n'aurions pas pu discriminer les endosomes précoces provenant du neurone d'intérêt et des cellules environnantes au sein d'un *z-stack* lors de la détection automatique des spots. En microscopie électronique, nous avons mesuré de manière semi-quantitative une augmentation du nombre d'endosomes précoces agrégés dans les BFCN de souris Ts65Dn. A nouveau, ces résultats suggèrent que l'augmentation de la taille des endosomes précoces n'est pas retrouvée à haute résolution. La quantification du nombre d'endosomes précoces agrégés n'est pas exhaustive et nous ne pouvons pas conclure sur le nombre d'endosomes précoces par cellule comme pour les fibroblastes en microscopie électronique. Nos images de marquages cathepsine B chez la souris Ts65Dn montrent que le nombre de lysosomes est augmenté dans les BFCN. Ces observations suggèrent que ce phénotype est spécifique aux BFCN, car les neurones non-cholinergiques de cette région ne semblent pas être touchés. La souris Ts65Dn ne présente pas de déposition extracellulaire de peptide A β . Les anomalies endo-lysosomales observées dans les BFCN de Ts65Dn ne sont donc pas dues à une toxicité de l'A β autour des somas de ces neurones. En revanche, la diminution de la production d'A β est efficace contre les troubles cognitifs dans la souris Ts65Dn (Illouz et al., 2019). L'A β intracellulaire et extracellulaire soluble est donc délétère et pourrait être impliqué dans les anomalies endosomales dans cette souris.

Nous avons ensuite étudié la morphologie des endosomes précoces en condition trisomie 21 dans un modèle jamais utilisé jusqu'ici dans ce cadre : des neurones humains isogéniques dérivés d'iPSC. Ce modèle permet la comparaison des phénotypes endosomaux sur le même fond génétique, excluant donc toute variabilité inter-individuelle. La microscopie confocale confirme la présence d'endosomes précoces élargis dans les neurones T21, semblables à ceux observés dans les cellules périphériques avec le même type de microscopie. En microscopie confocale, le nombre d'endosomes précoces est augmenté dans les neurones T21, contrairement aux fibroblastes où la microscopie confocale ne révèle pas de modification du nombre d'endosomes précoces. Cette différence est certainement due à une variabilité importante entre types cellulaires. Afin d'étudier la morphologie à haute-résolution des endosomes précoces dans ces neurones, nous avons utilisé un microscope SR-SIM. Observés avec cette technique, les endosomes précoces n'ont pas un volume modifié en condition trisomie 21. La comparaison entre microscopie à champ large ou microscopie confocale et microscopie SR-SIM permet d'affirmer que les endosomes élargis correspondent à des agrégats d'endosomes de taille normale. Ce résultat rejoint les quantifications effectuées dans les LCL et fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21 à partir d'images de microscopie électronique. La microscopie SR-SIM permet d'imager et quantifier facilement les endosomes précoces en 3 dimensions, ce qui est fastidieux en microscopie électronique. Nous avons donc pu compter les agrégats d'endosomes précoces observés sur les images de SR-SIM. Les agrégats d'endosomes précoces sont plus nombreux en condition trisomie 21. En revanche, le nombre d'endosomes précoces est significativement diminué dans les neurones T21. Ce résultat entre en contradiction avec nos quantifications du nombre d'endosomes en microscopie électronique après congélation à haute-pression dans les fibroblastes. De plus, l'agrégation des endosomes en condition trisomie 21 devrait aboutir à une augmentation du nombre d'endosomes dans les neurones T21 en SR-SIM par rapport à la microscopie confocale où moins d'endosomes sont distinguables. Cette contradiction est expliquée par la reconstruction des images super-résolues. En effet, l'algorithme reconstruit une image à partir des points ayant une intensité de fluorescence élevée. Une partie des endosomes précoces est donc perdue dans le processus de reconstruction. Il s'agit généralement des endosomes précoces de petite taille, dont l'intensité de fluorescence est plus faible. Cette limite de la microscopie SR-SIM est à considérer lors de l'étude de vésicules d'intensité très variable. De plus, les paramètres de détection sont différents pour les images de microscopie confocale et SR-SIM. Il est donc ardu de comparer le nombre d'endosomes précoces quantifié par microscopie confocale et par SR-SIM. Une quantification du nombre d'endosomes précoces

dans ces neurones par microscopie électronique serait moins exhaustive mais plus proche de la réalité que celle réalisée en SR-SIM. Ces techniques d'imagerie présentent donc des atouts complémentaires pour étudier la taille et le nombre d'endosomes précoces.

Enfin, nous avons observé des endosomes précoces de neurones de cortex préfrontal d'un individu porteur de trisomie 21 par microscopie SR-SIM. Les images obtenues sont similaires à celles des neurones dérivés d'iPSC. Les endosomes précoces élargis correspondent à des agrégats d'endosomes précoces qui semblent être de taille normale. De plus, l'algorithme de reconstruction informatique des images super-résolues élimine l'autofluorescence due à la lipofuscine, permettant ainsi de filtrer uniquement le signal provenant des endosomes précoces. L'autofluorescence de la lipofuscine empêche généralement l'utilisation de la microscopie de fluorescence sur le tissu humain. Cet aspect de l'imagerie SIM est donc particulièrement intéressant pour ce type d'étude. Dans notre cas, le tissu utilisé a été stocké 20 ans dans le formol, sa qualité en était détériorée. Par exemple, le marquage des noyaux au DAPI ne fonctionnait pas dans ce tissu, alors qu'il fonctionnait normalement dans un tissu contrôlé récemment prélevé et stocké dans le formol (1 an). L'identification des neurones à l'aide d'anticorps ou d'un marquage histologique s'est également révélée négative (marquages NeuN, MAP2 et marquage Nissl fluorescent). C'est pourquoi la quantification de la taille et du nombre d'endosomes précoces dans les neurones de cortex préfrontal n'a pas pu être réalisée, malgré un signal Rab5 satisfaisant en SR-SIM. Dans le cadre d'un projet européen, l'équipe a récemment eu accès à des coupes en paraffine de cerveaux provenant d'individus porteurs de trisomie 21 dont le délai *post-mortem* est très faible. De plus, des membres de l'équipe ont mis au point une méthode d'imagerie de marquages immunofluorescents sur tissus humains permettant d'éliminer l'autofluorescence de la lipofuscine. Ces échantillons et méthodes permettront de réaliser des quantifications morphologiques sur les endosomes précoces de tissu cérébral dans de meilleures conditions. L'ensemble de ces résultats redéfinit le phénotype endosomal dans la trisomie 21. Plutôt qu'un élargissement des endosomes précoces, on observe des endosomes de taille normale (figure 39). Ces endosomes sont plus nombreux en condition trisomie 21. L'augmentation du nombre d'endosomes précoces favorise l'observation d'agrégats ou endosomes proches, phénomène qui semble être amplifié par la fixation chimique. C'est pourquoi ils apparaissent élargis à résolution de microscopie optique classique.

Les valeurs obtenues dans nos quantifications (résumées en table 4) morphologiques sont assez difficiles à comparer à celles obtenues dans les articles portant sur cette thématique. Contrairement aux études précédemment publiées, nos quantifications de microscopie

confocale sont réalisées en 3 dimensions (à l'exception des souris Ts65Dn). Néanmoins, les valeurs de surfaces d'endosomes précoces dans les fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21 publiées dans Cataldo et al. (2008) reflètent un phénotype plus marqué que celui que nous observons dans nos lignées. Les auteurs rapportent une augmentation de la surface des endosomes précoces d'un facteur 1,79. En admettant que les endosomes précoces soient sphériques, ce qui n'est pas tout à fait exact, cela représenterait une augmentation du volume des endosomes précoces d'un facteur 2,41, assez loin du facteur 1,19 que nous observons. Dans les fibroblastes analysés précédemment dans l'équipe, cela représenterait un facteur d'augmentation d'un facteur 1,55 du volume des endosomes précoces (correspondant aux 30 % d'augmentation de surface présentés en table 2 de l'introduction). Cet exemple montre que la variabilité entre les lignées de fibroblastes est à prendre en considération au sein de notre étude, ainsi que lors de comparaisons de nos résultats avec les études précédemment publiées. En cela, l'utilisation de cellules provenant d'individus porteurs de trisomie 21 en mosaïque apporte une réponse aux hypothèses sans faire intervenir de variabilité génétique.

Modèle	Type cellulaire	Technique	Condition	Taille moyenne	Test statistique (taille)	P-value	Nombre moyen	Test statistique (nombre)	P-value
Cellules périphériques humaines	LCL	ME (fixation)	2N (n = 28 cellules) T21 (n = 43 cellules)	0,0538 μm^2 0,0473 μm^2	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,566	-	-	-
		Confocal	2N (n = 3 lignées) T21 (n = 3 lignées)	0,6681 μm^3 0,7921 μm^3	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,0342	0,0854 endosomes précoces/ μm^2 0,0808 endosomes précoces/ μm^2	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,726
	Fibroblastes	ME (congélation haute-pression)	2N (n = 2 lignées) T21 (n = 3 lignées)	0,0913 nm^2 0,1133 nm^2	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,4875	0,0328 endosomes précoces/ μm^2 0,0577 endosomes précoces/ μm^2	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,0044
Souris Ts65Dn	BFCN du MSN	Confocal	WT (n = 4 souris) Ts65Dn (n = 5 souris)	0,1159 μm^2 0,137 μm^2	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,0432	-	-	-
Neurones humains	Neurones dérivés d'iPSC	Confocal	2N (n = 20 cellules) T21 (n = 20 cellules)	0,0477 μm^3 0,0533 μm^3	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,03	1,0941 endosomes précoces/ μm^2 1,3411 endosomes précoces/ μm^2	Test de Mann Whitney	0,0043
		SR-SIM	2N (n = 11 cellules) T21 (n = 14 cellules)	0,0165 μm^3 0,0147 μm^3	ANOVA hiérarchisée à effets mixtes	0,9528	1,313 endosomes précoces/ μm^2 0,8862 endosomes précoces/ μm^2	Test de Mann Whitney	0,0152

Table 4. Récapitulatif des quantifications morphologiques des endosomes précoces en condition T21 par rapport à la condition euploïde
Les p-value significatives sont indiquées en gras.

2. Discussion de la partie 2 des résultats : dynamique de la voie endosomale dans la trisomie 21

Cette partie s'intéressait à la dynamique des voies d'entrée et de sorties principales des endosomes précoces : endocytose, recyclage, dégradation. Pour cela, nous avons utilisé des cargos triés dans ces différentes voies afin d'observer leur cinétique de transport dans les compartiments endosomaux.

Nous avons d'abord étudié l'endocytose à l'aide de transferrine fluorescente. Une fois internalisée, la fluorescence de la transferrine a été mesurée par cytométrie en flux. Nous avons noté une variabilité importante entre lignées de fibroblastes, notamment au sein des 3 lignées d'individus porteurs de trisomie 21. En moyenne, nous n'avons pas observé de différence d'internalisation entre fibroblastes euploïdes et T21. Ces données entrent en contradiction avec une étude précédente (Cataldo et al., 2008), qui montrait une augmentation de l'endocytose de la transferrine dans des fibroblastes provenant d'individus porteurs de trisomie 21. Le protocole utilisé dans cet article diffère du nôtre car les techniques de mesure de transferrine internalisée ne sont pas les mêmes. Les auteurs ont incubé les fibroblastes dans un milieu contenant de la transferrine fluorescente pendant 5 et 15 minutes puis ils ont observé les cellules au microscope à épifluorescence et révélé la transferrine en western blot. A noter, les auteurs concluent à une augmentation de l'internalisation de transferrine sur une estimation visuelle car les images de microscopie et les western blots n'ont pas été quantifiés. Une étude avait également conclu à une augmentation de l'endocytose de la HRP dans une lignée de fibroblaste d'individus porteurs de trisomie 21 en mesurant la surface des spot HRP-positifs après des temps d'internalisation de 5 et 30 minutes (Kim et al., 2016). Il est cependant difficile de faire un lien concluant entre la dynamique de l'endocytose et la surface des vésicules endosomales, surtout dans un système où les endosomes précoces sont élargis. Dans notre cas, les fibroblastes ont internalisé la transferrine pendant 4 minutes, ils ont été décollés, rincés et fixés pour être en suspension avant l'analyse de cytométrie en flux. Une attention particulière a été portée sur le maintien de la température des rinçages et centrifugations à 4°C afin d'éviter le recyclage de la transferrine internalisée, mais le temps initial d'internalisation de 4 minutes est légèrement augmenté notamment à cause de l'étape de trypsine à 37°C pendant 3 minutes. On peut donc supposer

qu'une partie de la transferrine internalisée a pu être recyclée et libérée hors des cellules. Afin d'écarter ce problème, nous avons confirmé ce résultat dans une expérience d'internalisation de transferrine suivie de microscopie confocale et d'une quantification de l'intensité de fluorescence de la transferrine dans nos lignées de fibroblastes euploïdes et T21. D'un point de vue quantitatif, l'utilisation de la cytométrie en flux permet d'avoir accès à la moyenne de fluorescence d'un grand nombre de cellules (plusieurs centaines au minimum dans nos expériences). C'est pourquoi la portée quantitative et statistique de notre étude permet de conclure sur le niveau d'internalisation de la transferrine. Cela explique certainement les différences observées entre nos résultats et ceux précédemment publiés (Cataldo et al., 2008). Notre étude suggère une endocytose normale en condition trisomie 21.

La transferrine et son récepteur empruntent les voies de recyclage. Nous avons utilisé le récepteur à la transferrine pour évaluer la dynamique de recyclage dans les fibroblastes euploïdes et T21. Cet aspect de la voie endosomale n'avait pas été exploré auparavant dans la trisomie 21. Après avoir vérifié que la quantité de récepteurs à la transferrine localisés à la membrane plasmique est la même en condition euploïde et trisomie 21 à l'état stationnaire, nous montrons que le récepteur est plus rapidement recyclé vers la membrane plasmique en condition trisomie 21 après un protocole de recyclage (figure 39). Ce résultat est cohérent avec l'augmentation du nombre de vésicules Rab4-positives et l'augmentation du niveau d'expression de Rab4 observées dans des fibroblastes T21 (Cataldo et al., 2008, van der Sluijs et al., 1992) et dans la souris Ts65Dn (Cataldo et al., 2003). Dans la trisomie 21, la surexpression du miRNA-155 codé sur le HSA21 entraîne la diminution de SNX27 car il en régule négativement la transcription (Wang et al., 2013). SNX27 est un membre du rétromère impliqué dans le tri des cargos vers la voie de recyclage, mais cet aspect n'a pas été évalué dans Wang et al. (2013). Nous n'avons pas mesuré le niveau de SNX27 dans les fibroblastes, il serait donc intéressant de confirmer ce résultat et d'évaluer l'implication de SNX27 dans le recyclage en condition trisomie 21.

Enfin, nous avons étudié le tri vers la voie de dégradation à partir des endosomes précoces grâce au suivi de la dégradation du récepteur à l'EGF sur une durée de 2 heures. Nous confirmons que le niveau d'expression du récepteur est le même dans les fibroblastes euploïdes et T21, et nous montrons que la dégradation du récepteur à l'EGF est significativement retardée dans les fibroblastes T21 par rapport aux fibroblastes euploïdes (figure 39). L'article qui avait montré que la transferrine est plus internalisée en condition trisomie 21 avait également montré que l'EGF est plus internalisé sur une durée de 60 minutes (Cataldo et al., 2008). Comme mentionné ci-dessus pour la transferrine, le niveau d'EGF internalisé a été évalué visuellement et n'a pas

été quantifié. Bien que nous n'observions pas d'augmentation de l'endocytose de la transferrine, il serait nécessaire de contrôler la dynamique d'endocytose du récepteur à l'EGF dans notre système. Cette observation, ajoutée au phénotype d'augmentation du nombre d'endosomes dans les fibroblastes, suggère plutôt une anomalie de tri du cargo vers les MVB dans les fibroblastes T21. Le tri du récepteur à l'EGF dans la voie de dégradation dépend de son ubiquitination au niveau de sites phosphorylés. L'ubiquitination du récepteur à l'EGF lui permet d'être trié dans les ILV des MVB par le complexe ESCRT. Il serait intéressant de savoir si l'ubiquitination ou l'activité du récepteur sont modifiées en condition trisomie 21. Une expérience de microscopie électronique avec un immunomarquage des récepteurs à l'EGF nous permettrait de voir s'ils sont différenciellement distribués entre les ILV et la membrane limitante des MVB. Si nous observions une relocalisation du récepteur des ILV vers la membrane limitante des MVB, nous pourrions définitivement conclure à une anomalie de tri vers la voie de dégradation. Enfin, notre étude ne conclut pas sur la fonction lysosomale, peu décrite dans le cadre de la trisomie 21. Dans la trisomie 21, l'activité de la cathépsine D est augmentée (Cataldo et al., 2008). L'origine du retard de dégradation du récepteur à l'EGF pouvant également provenir directement des lysosomes, des expériences complémentaires portant sur l'activité protéasique des lysosomes dans notre système seront nécessaires.

Notre étude s'est intéressée à l'endocytose, au recyclage et à la voie de dégradation. Nous n'avons pas étudié le transport rétrograde de cargos vers le TGN. Cet aspect méritera d'être abordé dans le contexte de la trisomie 21 car il ne l'a jamais été dans la littérature, et PIKfyve (cible que nous modulons dans la partie 3), a un rôle dans le transport rétrograde (Rutherford et al., 2006).

3. Discussion de la partie 3 des résultats : étude moléculaire de la voie endosomale dans la trisomie 21

Après avoir étudié les aspects morphologiques et dynamiques de la voie endosomale, nous avons recherché des anomalies moléculaires au niveau de protéines et lipides connus pour leurs rôles de régulateurs des endosomes précoces (figure 39). D'abord, nous nous sommes intéressés au niveau de Rab5. Le niveau de cette GTPase est primordial dans la régulation des endosomes précoces car Rab5 recrute la plupart des effecteurs permettant aux endosomes précoces de fonctionner. Notamment, la surexpression de Rab5 favorise la fusion des endosomes précoces et donc l'augmentation de leur taille. Une étude précédemment publiée avait montré que le niveau de Rab5 est augmenté dans les fibroblastes T21 (Cataldo et al., 2008). Cette équipe a ensuite montré que le β -CTF recrute APPL1 aux endosomes précoces, stabilisant Rab5 dans son état activé et augmentant la fusion entre endosomes précoces (Kim et al., 2016). A noter, l'augmentation de l'activation de Rab5 n'a jamais été directement démontrée dans des fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21. Elle l'a été uniquement dans des cultures primaires de BFCN de souris Ts65Dn (Xu et al., 2016). Dans la première partie de notre étude nous montrons à haute résolution que les endosomes précoces sont de taille normale dans la trisomie 21. Dans la partie 3, nous montrons que le niveau de Rab5 est significativement diminué dans les fibroblastes T21. Ce résultat est donc cohérent avec nos observations morphologiques. De plus, ce résultat est également en accord avec nos observations sur la dynamique d'endocytose et de recyclage de la transferrine et de son récepteur. En effet, la surexpression de Rab5 activé entraîne l'élargissement des endosomes, l'augmentation de l'endocytose et inhibe la voie de recyclage. A l'inverse, la surexpression de Rab5 inactif entraîne l'augmentation du nombre d'endosomes précoces de petite taille, ne modifie pas l'endocytose et augmente le recyclage des cargos (Stenmark et al., 1994). L'expression de la forme inactive de Rab5 causerait également un ralentissement de la dégradation du récepteur à l'EGF, autre phénotype que nous observons (Barbieri et al., 2000, Chen and Wang, 2001). Dans la partie 2, nous n'avons pas identifié de modification de l'endocytose et nous avons observé une accélération du recyclage du récepteur à la transferrine en condition trisomie 21. Les phénotypes que nous observons sont donc cohérents avec la diminution du niveau de Rab5.

Notre étude nous permet de conclure sur le niveau de Rab5 total, mais ne conclut pas sur le niveau de Rab5 activé. Une étude a montré par GTP-pull down que l'activation de Rab5 augmente dans les BFCN en culture de souris Ts65Dn, et que ce même résultat est observé après transfection de formes mutées de l'APP dans ces neurones (Xu et al., 2016). L'équipe avait envoyé des lignées de LCL d'individus euploïdes et porteurs de trisomie 21 aux auteurs de cette étude afin qu'ils mesurent l'activité de Rab5 en double aveugle dans ces cellules avec leur technique de GTP-pull down. Nous n'avons pas observé de différence d'activation de Rab5 en condition trisomie 21 dans ces cellules (figure 38). Il serait néanmoins souhaitable d'évaluer le niveau d'activation de Rab5 dans les lignées de fibroblastes sur lesquelles nous avons travaillé dans le cadre de cette étude. Il n'existe malheureusement pas d'anticorps qui soit spécifique pour la forme active de Rab5 (la référence publiée dans Kim et al. (2016) a été retirée du catalogue du fournisseur). La forme active de Rab5 est liée à la membrane des endosomes précoces alors que la forme inactive est cytosolique. Une expérience de séparation des membranes et du cytosol suivie d'un western blot de Rab5 total permettrait donc de comparer les niveaux de Rab5 dans les deux compartiments et d'en déduire des différences d'activation entre condition euploïde et trisomie 21.

Nous nous sommes ensuite intéressés au niveau d'EEA1 en condition trisomie 21, car c'est un effecteur de Rab5 impliqué dans l'ancrage des endosomes précoces. Le niveau d'EEA1 est significativement augmenté dans les fibroblastes T21. Comme Rab5, EEA1 est une protéine à

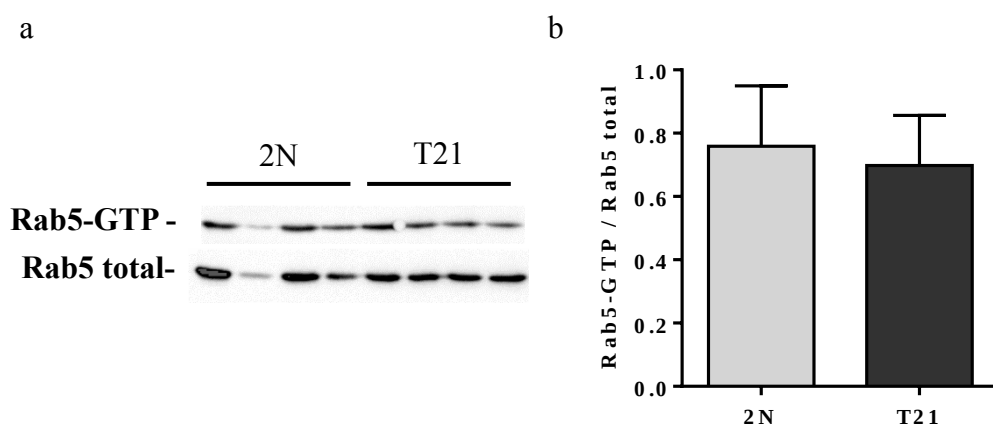


Figure 38. Activation de Rab5 dans des lignées de LCL

a. Illustration du niveau de Rab5-GTP par rapport à Rab5 total dans 4 lignées de LCL euploïdes et 4 lignées de LCL provenant d'individus porteurs de trisomie 21, après GTP pull-down réalisé par l'équipe de Chengbiao Wu (UCSD, USA) b. Quantification des signaux Rab5-GTP / Rab5 total, montrant qu'il n'y a pas de différence d'activation de Rab5 dans la condition trisomie 21 par rapport à la condition euploïde (une seule expérience, moyenne Rab5-GTP / Rab5 total $\pm$ SEM, test de Mann-Whitney, p-value > 0,999).

la fois cytosolique et membranaire. Le recrutement d'EEA1 par Rab5 et PI(3)P entraîne sa dimérisation à la membrane des endosomes précoces. Le niveau de Rab5 étant diminué en condition trisomie 21, l'augmentation du niveau d'EEA1 correspond certainement au *pool* cytosolique de la protéine. Pour confirmer cette hypothèse, il serait à nouveau intéressant de mesurer le niveau d'EEA1 par western blot dans les fractions cytosoliques et membranaires. Au niveau de l'imagerie microscopique, l'étude de la colocalisation entre ces protéines apporterait une information intéressante quant à leur recrutement aux endosomes précoces. La plupart des logiciels d'analyse d'image ne propose pas de quantification de la colocalisation en 3 dimensions. L'utilisation du plugin SODA (Statistical Object Distance Analysis) récemment développé sur le logiciel Icy permettrait de réaliser ce type d'analyse (Lagache et al., 2018).

De nombreuses anomalies dans la régulation des phosphoinositides ont été rapportées dans la maladie d'Alzheimer. Notamment, la diminution du niveau de PI(3)P et la dérégulation du tri de l'APP qui en découle ont mis en lumière une voie intéressante à explorer dans le cadre de la trisomie 21 (Morel et al., 2013). Par marquages fluorescents, nous avons mesuré le niveau de PI(3)P en condition euploïde et trisomie 21. Il serait souhaitable de confirmer cette observation microscopique en mesurant le niveau de PI(3)P par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC). La diminution du PI(3)P que nous rapportons est donc en accord avec les observations réalisées dans la maladie d'Alzheimer. L'origine de la diminution du niveau de PI(3)P dans la maladie d'Alzheimer n'est pas connue. La modulation de PIKfyve par l'APP nous a dirigé vers l'étude de cette kinase. Dans les fibroblastes T21, l'inhibition de PIKfyve restaure les niveaux d'EEA1 et la sécrétion d'A β . Une tendance similaire est également observée dans les fibroblastes euploïdes. L'effet de l'inhibition n'est donc pas strictement spécifique au génotype trisomie 21. D'un point de vue morphologique, l'inhibition de PIKfyve avec le YM201636 induit une vacuolisation (non montré) et entraîne l'augmentation de la taille des endosomes précoces dans les fibroblastes, comme cela avait déjà été rapporté dans d'autres types cellulaires (de Lartigue et al., 2009, Rutherford et al., 2006, Bissig et al., 2019). L'aspect ponctiforme du marquage correspond aux domaines EEA1 à la membrane limitante des endosomes précoces. Il a été montré que le nombre d'endosomes précoces EEA1-positifs diminue significativement après traitement au YM201636 (Bissig et al., 2019). On peut donc s'attendre à restaurer également l'augmentation du nombre d'endosomes précoces par l'inhibition de PIKfyve dans la trisomie 21, même si les phénotypes morphologiques qu'elle induit semblent radicaux et peu physiologiques. PIKfyve est impliqué dans la maturation des endosomes tardifs. Une étude a montré que la diminution du niveau de PIKfyve par siRNA n'impacte pas la cinétique de dégradation du récepteur à l'EGF ni le recyclage de la transferrine

(Rutherford et al., 2006), certainement parce que la co-expression d'un siRNA contre Vac14 (sous-unité activatrice du complexe PIKfyve) est nécessaire pour observer un effet sur la dégradation du récepteur à l'EGF (de Lartigue et al., 2009). L'utilisation du YM201636 a permis d'étudier l'activité de PIKfyve sans modifier son niveau d'expression. Il a été montré que l'inhibition de PIKfyve par YM201636 ralentit la dégradation du récepteur à l'EGF. Ce retard de dégradation serait dû à des anomalies de fusion entre compartiments tardifs plutôt qu'à un défaut de tri vers les ILV des MVB (de Lartigue et al., 2009). D'autres études ont montré que le PI(3,5)P₂ joue un rôle dans la formation des ILV dans la levure (Gary et al., 1998) et qu'il pourrait participer au tri de cargos vers les ILV en interagissant avec le complexe ESCRT (Whitley et al., 2003). Malgré tout, les rôles de PIKfyve et du PI(3,5)P₂ dans la régulation de l'homéostasie des endosomes précoces et tardifs restent débattus et assez mal connus. Il est donc difficile d'identifier comment l'inhibition de PIKfyve dans notre système permet de restaurer le niveau d'EEA1 et la production d'Aβ. Nous pourrions étudier l'effet du YM201636 sur la dégradation du récepteur à l'EGF en condition trisomie 21 afin de mieux comprendre si le retard de dégradation que nous observons peut être lié au défaut de PI(3)P et à la régulation de la maturation des endosomes tardifs par le PI(3,5)P₂.

Le YM201636 a été utilisé *in vivo* pour traiter le cancer du foie chez la souris, sans effet toxique majeur à l'échelle systémique. Le traitement au YM201636 pourra donc être envisagé dans le cadre d'une étude sur les performances cognitives après l'inhibition de PIKfyve, chez la souris Ts65Dn par exemple. Un autre inhibiteur de PIKfyve a été développé récemment : l'apilimod (Cai et al., 2013). L'apilimod serait plus puissant et plus spécifique que le YM201636, il serait donc intéressant de tester cette molécule dans notre système.

Chez la levure, il a été montré que PIKfyve peut réguler la V-ATPase. PIKfyve serait donc aussi impliqué dans l'acidification des endosomes tardifs et lysosomes. Il serait intéressant d'explorer cette piste afin de faire un lien entre l'APP et les défauts d'acidification observés dans la maladie d'Alzheimer par l'intermédiaire des phosphoinositides. La première étape serait de mesurer le pH intraluminal des différentes organelles de la voie endo-lysosomale dans des cellules modèles de la trisomie 21, notamment grâce à des sondes innovantes (Rosendale and Perrais, 2017). L'utilisation de sondes pH dans nos fibroblastes est prévue dans notre équipe. Enfin, le rôle de l'inhibition de PIKfyve sur le métabolisme de l'APP reste à étudier. Il a été montré qu'un défaut de tri de l'APP vers les ILV des MVB entraîne l'augmentation de la sécrétion d'Aβ (Morel et al., 2013). Nos résultats sont cohérents avec cette observation. En effet, nous montrons dans la trisomie 21 que la dégradation du récepteur à l'EGF est retardée,

potentiellement par un défaut d'adressage vers les ILV, et que la sécrétion d'A β est diminuée par l'inhibition de PIKfyve. L'ensemble de ces observations pointent vers un défaut de tri des cargos et de maturation des endosomes dans la trisomie 21. En retour, l'accumulation d'A β dans des neurones en culture de souris transgénique portant la mutation swedish de l'APP entraîne un retard de dégradation du récepteur à l'EGF (Almeida et al., 2006). Ces résultats suggèrent que la production d'A β alimente les anomalies endosomales dans la trisomie 21.

Dans la trisomie 21, l'équipe a montré que la triplication du gène *SYNJ1* est impliquée dans les anomalies endosomales (Cossec et al., 2012). La diminution de *SYNJ1* par shRNA restaure le phénotype d'élargissement des endosomes précoces dans la trisomie 21 en microscopie confocale, que nous considérons désormais comme une augmentation du nombre de vésicules. *SYNJ1* est impliqué dans le métabolisme des phosphoinositides, notamment en déphosphorylant les phosphates en position 5 et 4 du groupe inositol. Comme présenté dans l'introduction, *SYNJ1* peut également déphosphoryler en position 3, grâce à son domaine SAC1. *SYNJ1* pourrait donc participer à la diminution de PI(3)P que nous observons (Guo et al., 1999, Nemoto et al., 2000). Il sera intéressant d'étudier l'inhibition de l'expression de l'APP et de *SYNJ1* dans les fibroblastes T21 afin d'observer lequel de ces deux gènes candidats est susceptible de causer les phénotypes que nous décrivons.

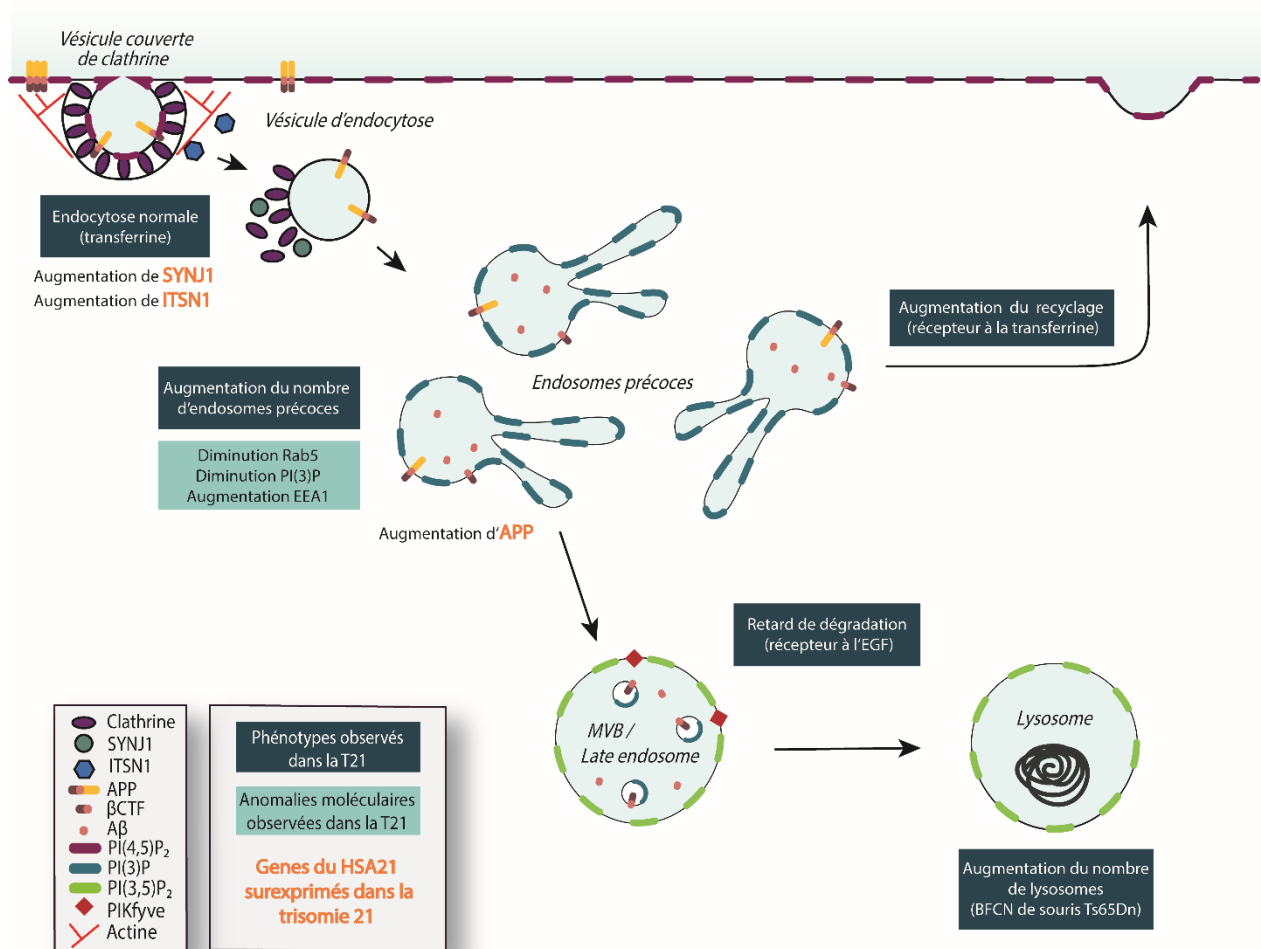


Figure 39. Schéma des anomalies endo-lysosomales observées dans notre étude

4. Conclusion et perspectives

Nous avons réalisé une étude de caractérisation des endosomes précoces dans la trisomie 21 à différentes échelles : morphologique, dynamique et moléculaire. Nos résultats apportent plusieurs aspects nouveaux à l'étude des anomalies endosomales dans la trisomie 21. Premièrement, nous avons redéfini la morphologie des endosomes précoces dans de nombreux modèles grâce à l'utilisation de techniques de microscopie adaptées à la taille de ces vésicules. Ensuite, nous avons analysé de manière quantitative la cinétique de différentes voies d'entrée et de sorties des endosomes précoces. Enfin, nous mesurons les niveaux de régulateurs majeurs de la voie endosomale et nous modulons la voie des phosphoinositides pour restaurer certains phénotypes.

D'un point de vue technique, l'évolution des méthodes d'exploration cellulaire bénéficiera à la compréhension des phénotypes anormaux que nous observons. Il sera nécessaire à l'avenir de caractériser le compartiment endosomal avec des méthodes d'imagerie super-résolutive innovantes, ainsi que d'utiliser la microscopie *live* pour explorer pleinement la dynamique de ces compartiments. La partie dynamique et moléculaire de notre étude a été basée sur l'utilisation de fibroblastes d'individus porteurs de trisomie 21. Ce modèle est avantageux sur de nombreux points : système humain, facilité de culture, taille des cellules importante favorisant l'observation microscopique, compartiment endosomal particulièrement dynamique. Ce type cellulaire périphérique n'est malheureusement pas entièrement adapté à l'étude d'une maladie neurodégénérative. Les neurones ont un système endosomal particulier car il est impliqué dans la neurotransmission. Dans l'élément pré-synaptique, les endosomes précoces participent au cycle de renouvellement des vésicules synaptiques, bien que les vésicules synaptiques soient majoritairement reformées sans passer par les endosomes précoces. A l'élément post-synaptique, la régulation de la densité de récepteurs aux neurotransmetteurs à la membrane plasmique fait intervenir le système endosomal pour recycler ou dégrader ces récepteurs selon les besoins en neurotransmission. Ces phénomènes sont potentiellement impactés par les anomalies endosomales que nous décrivons. L'utilisation de neurones dérivés d'iPSC permettra de replacer les anomalies endosomales dans un cadre plus pertinent à l'étude de la neurodégénération.

La complexité de la régulation du système endo-lysosomal, la diversité des phénotypes que nous observons et le nombre important de gènes tripliqués dans la trisomie 21 suggèrent une origine multifactorielle aux anomalies endosomales. Cette conclusion rejoint l'hypothèse de « l'embouteillage » endosomal récemment formulée dans le cadre de la maladie d'Alzheimer (Small et al., 2017). Les auteurs suggèrent que les facteurs de risque génétiques de la maladie d'Alzheimer peuvent être regroupés en 4 catégories (trafic endosomal, métabolisme du cholestérol, réponse immunitaire et métabolisme de l'APP) et que les voies contrôlées par ces gènes peuvent toutes converger vers les anomalies endosomales. Les endosomes seraient donc un carrefour entre les voies à risque dans la maladie d'Alzheimer d'où émaneraient les anomalies pathologiques (figure 40). Dans la trisomie 21, les origines génétiques des anomalies endosomales sont différentes des facteurs de risque génétiques de la maladie d'Alzheimer. Il faut donc être prudent dans la comparaison de la maladie d'Alzheimer entre population générale et individus porteurs de trisomie 21. D'un point de vue mécanistique, la surexpression de gènes tels que l'APP est à l'origine des anomalies endosomales dans la trisomie 21. Dans la maladie d'Alzheimer, la place de l'APP et de l'A β dans la cascade physiopathologique au niveau endosomal est moins claire. Néanmoins, le clivage de l'APP et la production anormale d'A β ont principalement lieu dans les endosomes précoces dans les deux maladies. Jusqu'à présent, il a plutôt été suggéré que le clivage anormal de l'APP, et ses produits de clivage tels que le β -CTF et l'A β , étaient à l'origine des anomalies endosomales (Jiang et al., 2010, Kim et al., 2016, Xu et al., 2016). Une étude a montré que certains facteurs de risque associés à la régulation de l'endocytose clathrine-dépendante peuvent modifier la toxicité de l'A β (Treusch et al., 2011). On considère donc de plus en plus le rôle causal des dérégulations endosomales dans la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, où l'APP seul n'est plus au centre des hypothèses. Dans le cadre des neurones, l'A β accumulé dans les endosomes (Gouras et al., 2010) est sécrété dans le milieu extracellulaire où il pourra s'agréger et former des dépôts amyloïdes. Dans le même temps, les formes solubles d'A β sont susceptibles d'être endocytées dans les endosomes précoces, où elles pourront participer aux anomalies endosomales. Un cercle vicieux entre les anomalies endosomales et la production pathologique d'A β s'installerait alors (figure 40). L'origine de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer, dans la population générale comme chez les individus porteurs de trisomie 21, reste à découvrir. Dans ce cadre, les endosomes précoces passent progressivement du statut de phénotype secondaire au statut de facteur causal.

Les anomalies endosomales font partie des phénotypes les plus précoces de la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 2000). Les endosomes constituent donc une cible pertinente dans la recherche de biomarqueurs permettant un diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer. La variabilité des phénotypes endosomaux que nous avons caractérisés les rend difficilement compatibles avec un diagnostic fiable, mais la poursuite de l'étude des endosomes dans la maladie d'Alzheimer mettra certainement au jour une signature pathologique utilisable dans ce cadre. Au vu du rôle central du système endo-lysosomal dans la maladie, le développement de traitements visant ce système serait certainement efficace mais difficilement spécifique à l'échelle cellulaire comme systémique. Dans tous les cas, l'exploration des anomalies endosomales ouvrira certainement des perspectives centrales dans la compréhension de la pathogénèse de la maladie d'Alzheimer.

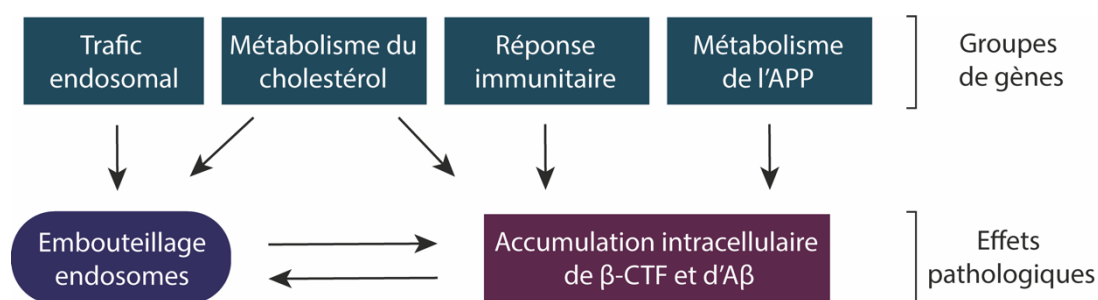


Figure 40. Interactions entre facteurs de risque génétiques de la maladie d'Alzheimer et phénotypes pathologiques
D'après (Small et al., 2017).

REFERENCES

- AIZENSTEIN, H. J., NEBES, R. D., SAXTON, J. A., PRICE, J. C., MATHIS, C. A., TSOPELAS, N. D., ZIOLKO, S. K., JAMES, J. A., SNITZ, B. E., HOUCK, P. R., BI, W., COHEN, A. D., LOPRESTI, B. J., DEKOSKY, S. T., HALLIGAN, E. M. & KLUNK, W. E. 2008. Frequent amyloid deposition without significant cognitive impairment among the elderly. *Arch Neurol*, 65, 1509-17.
- ALMEIDA, C. G., TAKAHASHI, R. H. & GOURAS, G. K. 2006. Beta-amyloid accumulation impairs multivesicular body sorting by inhibiting the ubiquitin-proteasome system. *J Neurosci*, 26, 4277-88.
- ANDERSON, R. G., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 1977. Role of the coated endocytic vesicle in the uptake of receptor-bound low density lipoprotein in human fibroblasts. *Cell*, 10, 351-64.
- ANDERSON, R. G., GOLDSTEIN, J. L. & BROWN, M. S. 1976. Localization of low density lipoprotein receptors on plasma membrane of normal human fibroblasts and their absence in cells from a familial hypercholesterolemia homozygote. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73, 2434-8.
- ANDO, K., BRION, J. P., STYGELBOUT, V., SUAIN, V., AUTHELET, M., DEDECKER, R., CHANUT, A., LACOR, P., LAFAUR, J., SAZDOVITCH, V., ROGAEVA, E., POTIER, M. C. & DUYCKAERTS, C. 2013. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol*, 125, 861-78.
- ANDO, K., TOMIMURA, K., SAZDOVITCH, V., SUAIN, V., YILMAZ, Z., AUTHELET, M., NDJIM, M., VERGARA, C., BELKOUCH, M., POTIER, M. C., DUYCKAERTS, C. & BRION, J. P. 2016. Level of PICALM, a key component of clathrin-mediated endocytosis, is correlated with levels of phosphotau and autophagy-related proteins and is associated with tau inclusions in AD, PSP and Pick disease. *Neurobiol Dis*, 94, 32-43.
- ANTONESCUCU, C. N., AGUET, F., DANUSER, G. & SCHMID, S. L. 2011. Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphate regulates clathrin-coated pit initiation, stabilization, and size. *Mol Biol Cell*, 22, 2588-600.
- ARAI, Y., IJUIN, T., TAKENAWA, T., BECKER, L. E. & TAKASHIMA, S. 2002. Excessive expression of synaptotagmin in brains with Down syndrome. *Brain Dev*, 24, 67-72.
- ARMSTRONG, A., MATTSSON, N., APPELQVIST, H., JANEFJORD, C., SANDIN, L., AGHOLME, L., OLSSON, B., SVENSSON, S., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H. & KAGEDAL, K. 2014. Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 16, 150-60.
- ARRIAGADA, P. V., GROWDON, J. H., HEDLEY-WHITE, E. T. & HYMAN, B. T. 1992. Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology*, 42, 631-9.
- AVRAHAMI, L., FARFARA, D., SHAHAM-KOL, M., VASSAR, R., FRENKEL, D. & ELDAR-FINKELMAN, H. 2013. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 ameliorates beta-amyloid pathology and restores lysosomal acidification and mammalian target of rapamycin activity in the Alzheimer disease mouse model: in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem*, 288, 1295-306.
- BACHE, K. G., BRECH, A., MEHLUM, A. & STENMARK, H. 2003a. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, 162, 435-42.
- BACHE, K. G., RAIBORG, C., MEHLUM, A. & STENMARK, H. 2003b. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem*, 278, 12513-21.
- BAKER-NIGH, A., VAHEDI, S., DAVIS, E. G., WEINTRAUB, S., BIGIO, E. H., KLEIN, W. L. & GEULA, C. 2015. Neuronal amyloid-beta accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*, 138, 1722-37.
- BALKLAVA, Z., NIEHAGE, C., CURRINN, H., MELLOR, L., GUSCOTT, B., POULIN, G., HOFACK, B. & WASSMER, T. 2015. The Amyloid Precursor Protein Controls PIKfyve Function. *PLoS One*, 10, e0130485.
- BALLARD, C., GAUTHIER, S., CORBETT, A., BRAYNE, C., AARSLAND, D. & JONES, E. 2011. Alzheimer's disease. *Lancet*, 377, 1019-31.
- BARBIERI, M. A., ROBERTS, R. L., GUMUSBOGA, A., HIGHFIELD, H., ALVAREZ-DOMINGUEZ, C., WELLS, A. & STAHL, P. D. 2000. Epidermal growth factor and membrane trafficking. EGF receptor activation of endocytosis requires Rab5a. *J Cell Biol*, 151, 539-50.

- BARNES, D. E. & YAFFE, K. 2011. The projected effect of risk factor reduction on Alzheimer's disease prevalence. *Lancet Neurol*, 10, 819-28.
- BASKIN, D. S., BROWNING, J. L., PIROZZOLO, F. J., KORPORAAL, S., BASKIN, J. A. & APPEL, S. H. 1999. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 56, 1121-3.
- BELICHENKO, P. V., KLESCHEVNIKOV, A. M., BECKER, A., WAGNER, G. E., LYSENKO, L. V., YU, Y. E. & MOBLEY, W. C. 2015. Down Syndrome Cognitive Phenotypes Modeled in Mice Trisomic for All HSA 21 Homologues. *PLoS One*, 10, e0134861.
- BENESCH, S., LOMMEL, S., STEFFEN, A., STRADAL, T. E., SCAPLEHORN, N., WAY, M., WEHLAND, J. & ROTTNER, K. 2002. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP2)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem*, 277, 37771-6.
- BENESCH, S., POLO, S., LAI, F. P., ANDERSON, K. I., STRADAL, T. E., WEHLAND, J. & ROTTNER, K. 2005. N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, 118, 3103-15.
- BERMAN, D. E., DALL'ARMI, C., VORONOV, S. V., MCINTIRE, L. B., ZHANG, H., MOORE, A. Z., STANISZEWSKI, A., ARANCIO, O., KIM, T. W. & DI PAOLO, G. 2008. Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism. *Nat Neurosci*, 11, 547-54.
- BEYREUTHER, K., POLLWEIN, P., MULTHAUP, G., MONNING, U., KONIG, G., DYRKES, T., SCHUBERT, W. & MASTERS, C. L. 1993. Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 695, 91-102.
- BISSIG, C., CROISE, P., HEILIGENSTEIN, X., HURBAIN, I., LENK, G. M., KAUFMAN, E., SANNERUD, R., ANNAERT, W., MEISLER, M. H., WEISMAN, L. S., RAPOSO, G. & VAN NIEL, G. 2019. The PIKfyve complex regulates the early melanosome homeostasis required for physiological amyloid formation. *J Cell Sci*, 132.
- BITSIKAS, V., CORREA, I. R., JR. & NICHOLS, B. J. 2014. Clathrin-independent pathways do not contribute significantly to endocytic flux. *Elife*, 3, e03970.
- BITTLES, A. H., BOWER, C., HUSSAIN, R. & GLASSON, E. J. 2007. The four ages of Down syndrome. *Eur J Public Health*, 17, 221-5.
- BOISSIERE, F., FAUCHEUX, B., AGID, Y. & HIRSCH, E. C. 1997. Choline acetyltransferase mRNA expression in the striatal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett*, 225, 169-72.
- BONIFACINO, J. S. & HURLEY, J. H. 2008. Retromer. *Curr Opin Cell Biol*, 20, 427-36.
- BORCHELT, D. R., THINAKARAN, G., ECKMAN, C. B., LEE, M. K., DAVENPORT, F., RATOVITSKY, T., PRADA, C. M., KIM, G., SEEKINS, S., YAGER, D., SLUNT, H. H., WANG, R., SEEGER, M., LEVEY, A. I., GANDY, S. E., COPELAND, N. G., JENKINS, N. A., PRICE, D. L., YOUNKIN, S. G. & SISODIA, S. S. 1996. Familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 variants elevate Abeta1-42/1-40 ratio in vitro and in vivo. *Neuron*, 17, 1005-13.
- BOULANT, S., KURAL, C., ZEEH, J. C., UBELMANN, F. & KIRCHHAUSEN, T. 2011. Actin dynamics counteract membrane tension during clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol*, 13, 1124-31.
- BRAAK, H. & BRAAK, E. 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82, 239-59.
- BRAAK, H. & DEL TREDICI, K. 2011. The pathological process underlying Alzheimer's disease in individuals under thirty. *Acta Neuropathol*, 121, 171-81.
- BRAELL, W. A., SCHLOSSMAN, D. M., SCHMID, S. L. & ROTHMAN, J. E. 1984. Dissociation of clathrin coats coupled to the hydrolysis of ATP: role of an uncoating ATPase. *J Cell Biol*, 99, 734-41.
- BRIGHT, N. A., GRATIAN, M. J. & LUZIO, J. P. 2005. Endocytic delivery to lysosomes mediated by concurrent fusion and kissing events in living cells. *Curr Biol*, 15, 360-5.

- BRIGHT, N. A., LINDSAY, M. R., STEWART, A. & LUZIO, J. P. 2001. The relationship between luminal and limiting membranes in swollen late endocytic compartments formed after wortmannin treatment or sucrose accumulation. *Traffic*, 2, 631-42.
- BRONFMAN, F. C., ESCUDERO, C. A., WEIS, J. & KRUTTGEN, A. 2007. Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. *Dev Neurobiol*, 67, 1183-203.
- BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 1976. Analysis of a mutant strain of human fibroblasts with a defect in the internalization of receptor-bound low density lipoprotein. *Cell*, 9, 663-74.
- BROWNE, S. E., LIN, L., MATTSSON, A., GEORGIEVSKA, B. & ISACSON, O. 2001. Selective antibody-induced cholinergic cell and synapse loss produce sustained hippocampal and cortical hypometabolism with correlated cognitive deficits. *Exp Neurol*, 170, 36-47.
- BUCCI, C., PARTON, R. G., MATHER, I. H., STUNNENBERG, H., SIMONS, K., HOFLACK, B. & ZERIAL, M. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70, 715-28.
- BUCHER, D., FREY, F., SOCHACKI, K. A., KUMMER, S., BERGEEST, J. P., GODINEZ, W. J., KRAUSSLICH, H. G., ROHR, K., TARASKA, J. W., SCHWARZ, U. S. & BOULANT, S. 2018. Clathrin-adaptor ratio and membrane tension regulate the flat-to-curved transition of the clathrin coat during endocytosis. *Nat Commun*, 9, 1109.
- BUEE, L., BUSSIERE, T., BUEE-SCHERRER, V., DELACOURTE, A. & HOF, P. R. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation and role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev*, 33, 95-130.
- BURD, C. G. & EMR, S. D. 1998. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell*, 2, 157-62.
- BURDA, P., PADILLA, S. M., SARKAR, S. & EMR, S. D. 2002. Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J Cell Sci*, 115, 3889-900.
- BURDICK, D., SOREGHAN, B., KWON, M., KOSMOSKI, J., KNAUER, M., HENSCHEN, A., YATES, J., COTMAN, C. & GLABE, C. 1992. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem*, 267, 546-54.
- CACACE, R., SLEEGERS, K. & VAN BROECKHOVEN, C. 2016. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimers Dement*, 12, 733-48.
- CAI, X., XU, Y., CHEUNG, A. K., TOMLINSON, R. C., ALCAZAR-ROMAN, A., MURPHY, L., BILLICH, A., ZHANG, B., FENG, Y., KLUMPP, M., RONDEAU, J. M., FAZAL, A. N., WILSON, C. J., MYER, V., JOBERTY, G., BOUWMEESTER, T., LABOW, M. A., FINAN, P. M., PORTER, J. A., PLOEGH, H. L., BAIRD, D., DE CAMILLI, P., TALLARICO, J. A. & HUANG, Q. 2013. PIKfyve, a class III PI kinase, is the target of the small molecular IL-12/IL-23 inhibitor apilimod and a player in Toll-like receptor signaling. *Chem Biol*, 20, 912-21.
- CALDERON-GARCIDUENAS, A. L. & DUYCKAERTS, C. 2017. Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*, 145, 325-337.
- CALLAGHAN, J., SIMONSEN, A., GAULLIER, J. M., TOH, B. H. & STENMARK, H. 1999. The endosome fusion regulator early-endosomal autoantigen 1 (EEA1) is a dimer. *Biochem J*, 338 (Pt 2), 539-43.
- CAO, C., BACKER, J. M., LAPORTE, J., BEDRICK, E. J. & WANDINGER-NESS, A. 2008. Sequential actions of myotubularin lipid phosphatases regulate endosomal PI(3)P and growth factor receptor trafficking. *Mol Biol Cell*, 19, 3334-46.
- CAPORASO, G. L., TAKEI, K., GANDY, S. E., MATTEOLI, M., MUNDIGL, O., GREENGARD, P. & DE CAMILLI, P. 1994. Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 14, 3122-38.
- CARLTON, J., BUJNY, M., PETER, B. J., OORSCHOT, V. M., RUTHERFORD, A., MELLOR, H., KLUMPERMAN, J., MCMAHON, H. T. & CULLEN, P. J. 2004. Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides. *Curr Biol*, 14, 1791-800.
- CARMONA-IRAGUI, M., BALASA, M., BENEJAM, B., ALCOLEA, D., FERNANDEZ, S., VIDELA, L., SALA, I., SANCHEZ-SAUDINOS, M. B., MORENAS-RODRIGUEZ, E., RIBOSA-NOGUE, R., ILLAN-GALA, I., GONZALEZ-ORTIZ, S., CLARIMON, J.,

- SCHMITT, F., POWELL, D. K., BOSCH, B., LLADO, A., RAFII, M. S., HEAD, E., MOLINUEVO, J. L., BLESÁ, R., VIDELA, S., LLEO, A., SANCHEZ-VALLE, R. & FORTEA, J. 2017. Cerebral amyloid angiopathy in Down syndrome and sporadic and autosomal-dominant Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement*, 13, 1251-1260.
- CARMONA, S., HARDY, J. & GUERREIRO, R. 2018. The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*, 148, 395-408.
- CATALDO, A., REBECK, G. W., GHETRI, B., HULETTE, C., LIPPA, C., VAN BROECKHOVEN, C., VAN DUIJN, C., CRAS, P., BOGDANOVIC, N., BIRD, T., PETERHOFF, C. & NIXON, R. 2001. Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders. *Ann Neurol*, 50, 661-5.
- CATALDO, A. M., BARNETT, J. L., BERMAN, S. A., LI, J., QUARLESS, S., BURSZTAJN, S., LIPPA, C. & NIXON, R. A. 1995. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron*, 14, 671-80.
- CATALDO, A. M., BARNETT, J. L., MANN, D. M. & NIXON, R. A. 1996. Colocalization of lysosomal hydrolase and beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum and striatum in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 704-15.
- CATALDO, A. M., BARNETT, J. L., PIERONI, C. & 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*, 17, 6142-51.
- CATALDO, A. M., MATHEWS, P. M., BOITEAU, A. B., HASSINGER, L. C., PETERHOFF, C. M., JIANG, Y., MULLANEY, K., NEVE, R. L., GRUENBERG, J. & NIXON, R. A. 2008. Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *Am J Pathol*, 173, 370-84.
- CATALDO, A. M., PETANCESKA, S., PETERHOFF, C. M., TERIO, N. B., EPSTEIN, C. J., VILLAR, A., CARLSON, E. J., STAUFENBIEL, M. & NIXON, R. A. 2003. App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of down syndrome. *J Neurosci*, 23, 6788-92.
- CATALDO, A. M., PETANCESKA, S., TERIO, N. B., PETERHOFF, C. M., DURHAM, R., MERCKEN, M., MEHTA, P. D., BUXBAUM, J., HAROUTUNIAN, V. & NIXON, R. A. 2004. Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging*, 25, 1263-72.
- CATALDO, A. M., PETERHOFF, C. M., TRONCOSO, J. C., GOMEZ-ISLA, T., HYMAN, B. T. & 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, 277-86.
- CHAN, R. B., OLIVEIRA, T. G., CORTES, E. P., HONIG, L. S., DUFF, K. E., SMALL, S. A., WENK, M. R., SHUI, G. & DI PAOLO, G. 2012. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 287, 2678-88.
- CHAPUIS, J., HANSMANNEL, F., GISTELINCK, M., MOUNIER, A., VAN CAUWENBERGHE, C., KOLEN, K. V., GELLER, F., SOTTEJEAN, Y., HAROLD, D., DOURLIN, P., GRENIER-BOLEY, B., KAMATANI, Y., DELEPINE, B., DEMIAUTTE, F., ZELENKA, D., ZOMMER, N., HAMDANE, M., BELLENGUEZ, C., DARTIGUES, J. F., HAUW, J. J., LETRONNE, F., AYRAL, A. M., SLEEGERS, K., SCHELLENS, A., BROECK, L. V., ENGELBORGH, S., DE DEYN, P. P., VANDENBERGHE, R., O'DONOVAN, M., OWEN, M., EPELBAUM, J., MERCKEN, M., KARRAN, E., BANTSCHIEFF, M., DREWES, G., JOBERTY, G., CAMPION, D., OCTAVE, J. N., BERR, C., LATHROP, M., CALLAERTS, P., MANN, D., WILLIAMS, J., BUEE, L., DEWACHTER, I., VAN BROECKHOVEN, C., AMOUYEL, P., MOECHARS, D., DERMAUT, B. & LAMBERT, J. C. 2013. Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry*, 18, 1225-34.
- CHAVRIER, P., PARTON, R. G., HAURI, H. P., SIMONS, K. & ZERIAL, M. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, 62, 317-29.

- CHEN, C., JIANG, P., XUE, H., PETERSON, S. E., TRAN, H. T., MCCANN, A. E., PARAST, M. M., LI, S., PLEASURE, D. E., LAURENT, L. C., LORING, J. F., LIU, Y. & DENG, W. 2014a. Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 5, 4430.
- CHEN, C. K., BREGERE, C., PALUCH, J., LU, J. F., DICKMAN, D. K. & CHANG, K. T. 2014b. Activity-dependent facilitation of Synaptojanin and synaptic vesicle recycling by the Minibrain kinase. *Nat Commun*, 5, 4246.
- CHEN, X. & WANG, Z. 2001. Regulation of intracellular trafficking of the EGF receptor by Rab5 in the absence of phosphatidylinositol 3-kinase activity. *EMBO Rep*, 2, 68-74.
- CHEN, X. Q., SAWA, M. & MOBLEY, W. C. 2018. Dysregulation of neurotrophin signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease and of Alzheimer disease in Down syndrome. *Free Radic Biol Med*, 114, 52-61.
- CHOI, J. H., KAUR, G., MAZZELLA, M. J., MORALES-CORRALIZA, J., LEVY, E. & MATHEWS, P. M. 2013. Early endosomal abnormalities and cholinergic neuron degeneration in amyloid-beta protein precursor transgenic mice. *J Alzheimers Dis*, 34, 691-700.
- CHRISTOFORIDIS, S., MIACZYNSKA, M., ASHMAN, K., WILM, M., ZHAO, L., YIP, S. C., WATERFIELD, M. D., BACKER, J. M. & ZERIAL, M. 1999. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol*, 1, 249-52.
- CLAGUE, M. J., THORPE, C. & JONES, A. T. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase regulation of fluid phase endocytosis. *FEBS Lett*, 367, 272-4.
- COCUCCI, E., AGUET, F., BOULANT, S. & KIRCHHAUSEN, T. 2012. The first five seconds in the life of a clathrin-coated pit. *Cell*, 150, 495-507.
- COFFEY, E. E., BECKEL, J. M., LATIES, A. M. & MITCHELL, C. H. 2014. Lysosomal alkalization and dysfunction in human fibroblasts with the Alzheimer's disease-linked presenilin 1 A246E mutation can be reversed with cAMP. *Neuroscience*, 263, 111-24.
- COLACURCIO, D. J. & NIXON, R. A. 2016. Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing Res Rev*.
- COLACURCIO, D. J., PENSALFINI, A., JIANG, Y. & NIXON, R. A. 2018. Dysfunction of autophagy and endosomal-lysosomal pathways: Roles in pathogenesis of Down syndrome and Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med*, 114, 40-51.
- COLLINS, A., WARRINGTON, A., TAYLOR, K. A. & SVITKINA, T. 2011. Structural organization of the actin cytoskeleton at sites of clathrin-mediated endocytosis. *Curr Biol*, 21, 1167-75.
- COLOMBO, M., RAPOSO, G. & THERY, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.
- CONNOLLY, J. L., GREEN, S. A. & GREENE, L. A. 1984. Comparison of rapid changes in surface morphology and coated pit formation of PC12 cells in response to nerve growth factor, epidermal growth factor, and dibutyryl cyclic AMP. *J Cell Biol*, 98, 457-65.
- COOPER, J. D., SALEHI, A., DELCROIX, J. D., HOWE, C. L., BELICHENKO, P. V., CHUA-COUZENS, J., KILBRIDGE, J. F., CARLSON, E. J., EPSTEIN, C. J. & MOBLEY, W. C. 2001. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10439-44.
- COPPUS, A. M., SCHUUR, M., VERGEER, J., JANSSENS, A. C., OOSTRA, B. A., VERBEEK, M. M. & VAN DUIJN, C. M. 2012. Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Neurobiol Aging*, 33, 1988-94.
- CORDER, E. H., SAUNDERS, A. M., STRITTMATTER, W. J., SCHMECHEL, D. E., GASKELL, P. C., SMALL, G. W., ROSES, A. D., HAINES, J. L. & 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, 921-3.
- CORDY, J. M., HUSSAIN, I., DINGWALL, C., HOOPER, N. M. & TURNER, A. J. 2003. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11735-40.
- CORLIER, F., RIVALS, I., LAGARDE, J., HAMELIN, L., CORNE, H., DAUPHINOT, L., ANDO, K., COSSEC, J. C., FONTAINE, G., DOROTHEE, G., MALAPLATE-ARMAND, C.,

- OLIVIER, J. L., DUBOIS, B., BOTTLAENDER, M., DUYCKAERTS, C., SARAZIN, M., POTIER, M. C. & CLINICAL IMABIO, T. 2015. Modifications of the endosomal compartment in peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Transl Psychiatry*, 5, e595.
- COSSEC, J. C., LAVAUR, J., BERMAN, D. E., RIVALS, I., HOISCHEN, A., STORA, S., RIPOLL, C., MIRCHER, C., GRATTAU, Y., OLIVOMARIN, J. C., DE CHAUMONT, F., LECOURTOIS, M., ANTONARAKIS, S. E., VELTMAN, J. A., DELABAR, J. M., DUYCKAERTS, C., DI PAOLO, G. & POTIER, M. C. 2012. Trisomy for synaptojanin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. *Hum Mol Genet*, 21, 3156-72.
- COSSEC, J. C., MARQUER, C., PANCHAL, M., LAZAR, A. N., DUYCKAERTS, C. & POTIER, M. C. 2010a. Cholesterol changes in Alzheimer's disease: methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 839-45.
- COSSEC, J. C., SIMON, A., MARQUER, C., MOLDRICH, R. X., LETERRIER, C., ROSSIER, J., DUYCKAERTS, C., LENKEI, Z. & POTIER, M. C. 2010b. Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 846-52.
- COZIER, G. E., CARLTON, J., MCGREGOR, A. H., GLEESON, P. A., TEASDALE, R. D., MELLOR, H. & CULLEN, P. J. 2002. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem*, 277, 48730-6.
- CREMONA, O., DI PAOLO, G., WENK, M. R., LUTHI, A., KIM, W. T., TAKEI, K., DANIELL, L., NEMOTO, Y., SHEARS, S. B., FLAVELL, R. A., MCCORMICK, D. A. & DE CAMILLI, P. 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, 99, 179-88.
- CROSS, M. J., STEWART, A., HODGKIN, M. N., KERR, D. J. & WAKELAM, M. J. 1995. Wortmannin and its structural analogue demethoxyviridin inhibit stimulated phospholipase A2 activity in Swiss 3T3 cells. Wortmannin is not a specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, 270, 25352-5.
- CROWTHER, R. A., FINCH, J. T. & PEARSE, B. M. 1976. On the structure of coated vesicles. *J Mol Biol*, 103, 785-98.
- CURRINN, H., GUSCOTT, B., BALKLAVA, Z., ROTHNIE, A. & WASSMER, T. 2016. APP controls the formation of PI(3,5)P(2) vesicles through its binding of the PIKfyve complex. *Cell Mol Life Sci*, 73, 393-408.
- CURRINN, H. & WASSMER, T. 2016. The amyloid precursor protein (APP) binds the PIKfyve complex and modulates its function. *Biochem Soc Trans*, 44, 185-90.
- DAUMKE, O., ROUX, A. & HAUCKE, V. 2014. BAR domain scaffolds in dynamin-mediated membrane fission. *Cell*, 156, 882-92.
- DAVIS, C. G., LEHRMAN, M. A., RUSSELL, D. W., ANDERSON, R. G., BROWN, M. S. & GOLDSTEIN, J. L. 1986. The J.D. mutation in familial hypercholesterolemia: amino acid substitution in cytoplasmic domain impedes internalization of LDL receptors. *Cell*, 45, 15-24.
- DAVISSON, M. T., SCHMIDT, C. & AKESON, E. C. 1990. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res*, 360, 263-80.
- DAWSON, G. R., SEABROOK, G. R., ZHENG, H., SMITH, D. W., GRAHAM, S., O'DOWD, G., BOWERY, B. J., BOYCE, S., TRUMBAUER, M. E., CHEN, H. Y., VAN DER PLOEG, L. H. & SIRINATHSINGHI, D. J. 1999. Age-related cognitive deficits, impaired long-term potentiation and reduction in synaptic marker density in mice lacking the beta-amyloid precursor protein. *Neuroscience*, 90, 1-13.
- DE CHAUMONT, F., DALLONGEVILLE, S., CHENOUEARD, N., HERVE, N., POP, S., PROVOOST, T., MEAS-YEDID, V., PANKAJAKSHAN, P., LECOMTE, T., LE MONTAGNER, Y., LAGACHE, T., DUFOUR, A. & OLIVO-MARIN, J. C. 2012. Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods*, 9, 690-6.

- DE HOOP, M. J., HUBER, L. A., STENMARK, H., WILLIAMSON, E., ZERIAL, M., PARTON, R. G. & DOTTI, C. G. 1994. The involvement of the small GTP-binding protein Rab5a in neuronal endocytosis. *Neuron*, 13, 11-22.
- DE LARTIGUE, J., POLSON, H., FELDMAN, M., SHOKAT, K., TOOZE, S. A., URBE, S. & CLAGUE, M. J. 2009. PIKfyve regulation of endosome-linked pathways. *Traffic*, 10, 883-93.
- DE RENZIS, S., SONNICHSEN, B. & ZERIAL, M. 2002. Divalent Rab effectors regulate the sub-compartmental organization and sorting of early endosomes. *Nat Cell Biol*, 4, 124-33.
- DE ROSSI, P., ANDREW, R. J., MUSIAL, T. F., BUGGIA-PREVOT, V., XU, G., PONNUSAMY, M., LY, H., KRAUSE, S. V., RICE, R. C., DE L'ESTOILE, V., VALIN, T., SALEM, S., DESPA, F., BORCHELT, D. R., BINDOKAS, V. P., NICHOLSON, D. A. & THINAKARAN, G. 2018. Aberrant accrual of BIN1 near Alzheimer's disease amyloid deposits in transgenic models. *Brain Pathol*.
- DE ROSSI, P., BUGGIA-PREVOT, V., CLAYTON, B. L., VASQUEZ, J. B., VAN SANFORD, C., ANDREW, R. J., LESNICK, R., BOTTE, A., DEYTS, C., SALEM, S., RAO, E., RICE, R. C., PARENT, A., KAR, S., POPKO, B., PYTEL, P., ESTUS, S. & THINAKARAN, G. 2016. Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts. *Mol Neurodegener*, 11, 59.
- DE STROOPER, B. & ANNAERT, W. 2010. Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 235-60.
- DE STROOPER, B., SAFTIG, P., CRAESSAERTS, K., VANDERSTICHELE, H., GUHDE, G., ANNAERT, W., VON FIGURA, K. & VAN LEUVEN, F. 1998. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature*, 391, 387-90.
- DEKKER, A. D., SACCO, S., CARFI, A., BENEJAM, B., VERMEIREN, Y., BEUGELSDIJK, G., SCHIPPERS, M., HASSEFRAS, L., ELEVELD, J., GREFELMAN, S., FOPMA, R., BOMER-VEENBOER, M., BOTI, M., OOSTERLING, G. D. E., SCHOLTEN, E., TOLLENAERE, M., CHECKLEY, L., STRYDOM, A., VAN GOETHEM, G., ONDER, G., BLES, R., ZU EULENBURG, C., COPPUS, A. M. W., REBILLAT, A. S., FORTEA, J. & DE DEYN, P. P. 2018. The Behavioral and Psychological Symptoms of Dementia in Down Syndrome (BPSD-DS) Scale: Comprehensive Assessment of Psychopathology in Down Syndrome. *J Alzheimers Dis*, 63, 797-819.
- DELABAR, J. M., THEOPHILE, D., RAHMANI, Z., CHETTOUH, Z., BLOUIN, J. L., PRIEUR, M., NOEL, B. & SINET, P. M. 1993. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet*, 1, 114-24.
- DELACOURTE, A. & DEFOSSEZ, A. 1986. Alzheimer's disease: Tau proteins, the promoting factors of microtubule assembly, are major components of paired helical filaments. *J Neurol Sci*, 76, 173-86.
- DELAERE, P., HE, Y., FAYET, G., DUYCKAERTS, C. & HAUW, J. J. 1993. Beta A4 deposits are constant in the brain of the oldest old: an immunocytochemical study of 20 French centenarians. *Neurobiol Aging*, 14, 191-4.
- DELCROIX, J. D., VALLETTA, J. S., WU, C., HUNT, S. J., KOWAL, A. S. & MOBLEY, W. C. 2003. NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron*, 39, 69-84.
- DELEVOYE, C., MISEREY-LENKEI, S., MONTAGNAC, G., GILLES-MARSENS, F., PAUL-GILLOTEAUX, P., GIORDANO, F., WAHARTE, F., MARKS, M. S., GOUD, B. & RAPOSO, G. 2014. Recycling endosome tubule morphogenesis from sorting endosomes requires the kinesin motor KIF13A. *Cell Rep*, 6, 445-54.
- DERIVERY, E., SOUSA, C., GAUTIER, J. J., LOMBARD, B., LOEW, D. & GAUTREAU, A. 2009. The Arp2/3 activator WASH controls the fission of endosomes through a large multiprotein complex. *Dev Cell*, 17, 712-23.
- DI DOMENICO, F., COCCIA, R., COCCIOLO, A., MURPHY, M. P., CENINI, G., HEAD, E., BUTTERFIELD, D. A., GIORGI, A., SCHININA, M. E., MANCUSO, C., CINI, C. & PERLUIGI, M. 2013. Impairment of proteostasis network in Down syndrome prior to the development of Alzheimer's disease neuropathology: redox proteomics analysis of human brain. *Biochim Biophys Acta*, 1832, 1249-59.

- DI PAOLO, G. & DE CAMILLI, P. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443, 651-7.
- DIGGINS, N. L. & WEBB, D. J. 2017. APPL1 is a multifunctional endosomal signaling adaptor protein. *Biochem Soc Trans*, 45, 771-779.
- DODSON, S. E., ANDERSEN, O. M., KARMAI, V., FRITZ, J. J., CHENG, D., PENG, J., LEVEY, A. I., WILLNOW, T. E. & LAH, J. J. 2008. Loss of LR11/SORLA enhances early pathology in a mouse model of amyloidosis: evidence for a proximal role in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 28, 12877-86.
- DODSON, S. E., GEARING, M., LIPPA, C. F., MONTINE, T. J., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2006. LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 866-72.
- DORAN, E., KEATOR, D., HEAD, E., PHELAN, M. J., KIM, R., TOTOU, M., BARRIO, J. R., SMALL, G. W., POTKIN, S. G. & LOTT, I. T. 2017. Down Syndrome, Partial Trisomy 21, and Absence of Alzheimer's Disease: The Role of APP. *J Alzheimers Dis*, 56, 459-470.
- DRISKELL, O. J., MIRONOV, A., ALLAN, V. J. & WOODMAN, P. G. 2007. Dynein is required for receptor sorting and the morphogenesis of early endosomes. *Nat Cell Biol*, 9, 113-20.
- DRUBIN, D. G. & KIRSCHNER, M. W. 1986. Tau protein function in living cells. *J Cell Biol*, 103, 2739-46.
- DUBOIS, B., EPELBAUM, S., NYASSE, F., BAKARDJIAN, H., GAGLIARDI, G., USPENSKAYA, O., HOUOT, M., LISTA, S., CACCIAMANI, F., POTIER, M. C., BERTRAND, A., LAMARI, F., BENALI, H., MANGIN, J. F., COLLIOT, O., GENTHON, R., HABERT, M. O. & HAMPEL, H. 2018. Cognitive and neuroimaging features and brain beta-amyloidosis in individuals at risk of Alzheimer's disease (INSIGHT-preAD): a longitudinal observational study. *Lancet Neurol*, 17, 335-346.
- DUCHON, A., POTHION, S., BRAULT, V., SHARP, A. J., TYBULEWICZ, V. L., FISHER, E. M. & HERAULT, Y. 2011a. The telomeric part of the human chromosome 21 from Cstb to Prmt2 is not necessary for the locomotor and short-term memory deficits observed in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Behav Brain Res*, 217, 271-81.
- DUCHON, A., RAVEAU, M., CHEVALIER, C., NALESSO, V., SHARP, A. J. & HERAULT, Y. 2011b. Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome. *Mamm Genome*, 22, 674-84.
- DULEH, S. N. & WELCH, M. D. 2010. WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67, 193-206.
- DUNCKLEY, T., BEACH, T. G., RAMSEY, K. E., GROVER, A., MASTROENI, D., WALKER, D. G., LAFLEUR, B. J., COON, K. D., BROWN, K. M., CASELLI, R., KUKULL, W., HIGDON, R., MCKEEL, D., MORRIS, J. C., HULETTE, C., SCHMECHEL, D., REIMAN, E. M., ROGERS, J. & STEPHAN, D. A. 2006. Gene expression correlates of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27, 1359-71.
- DUYCKAERTS, C., CLAVAGUERA, F. & POTIER, M. C. 2019. The prion-like propagation hypothesis in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol*, 32, 266-271.
- DUYCKAERTS, C., DELATOUR, B. & POTIER, M. C. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 118, 5-36.
- EHEHALT, R., KELLER, P., HAASS, C., THIELE, C. & SIMONS, K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, 160, 113-23.
- FELDMAN, H., GABATHULER, R., KENNARD, M., NURMINEN, J., LEVY, D., FOTI, S., FOTI, D., BEATTIE, B. L. & JEFFERIES, W. A. 2001. Serum p97 levels as an aid to identifying Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 3, 507-516.
- FERNANDEZ-BORJA, M., WUBBOLTS, R., CALAFAT, J., JANSSEN, H., DIVECHA, N., DUSSELJEE, S. & NEEFJES, J. 1999. Multivesicular body morphogenesis requires phosphatidylinositol 3-kinase activity. *Curr Biol*, 9, 55-8.
- FORD, M. G., MILLS, I. G., PETER, B. J., VALLIS, Y., PRAEFCKE, G. J., EVANS, P. R. & MCMAHON, H. T. 2002. Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature*, 419, 361-6.

- FOTIN, A., CHENG, Y., SLIZ, P., GRIGORIEFF, N., HARRISON, S. C., KIRCHHAUSEN, T. & WALZ, T. 2004. Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature*, 432, 573-9.
- FUTTER, C. E., COLLINSON, L. M., BACKER, J. M. & HOPKINS, C. R. 2001. Human VPS34 is required for internal vesicle formation within multivesicular endosomes. *J Cell Biol*, 155, 1251-64.
- GAIDAROV, I. & KEEN, J. H. 1999. Phosphoinositide-AP-2 interactions required for targeting to plasma membrane clathrin-coated pits. *J Cell Biol*, 146, 755-64.
- GALLOWAY, C. J., DEAN, G. E., MARSH, M., RUDNICK, G. & MELLMAN, I. 1983. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3334-8.
- GARY, J. D., WURMSER, A. E., BONANGELINO, C. J., WEISMAN, L. S. & EMR, S. D. 1998. Fab1p is essential for PtdIns(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and membrane homeostasis. *J Cell Biol*, 143, 65-79.
- GAULLIER, J. M., SIMONSEN, A., D'ARRIGO, A., BREMNES, B., STENMARK, H. & AASLAND, R. 1998. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*, 394, 432-3.
- GAUTHIER, S. A., PEREZ-GONZALEZ, R., SHARMA, A., HUANG, F. K., ALLDRED, M. J., PAWLIK, M., KAUR, G., GINSBERG, S. D., NEUBERT, T. A. & LEVY, E. 2017. Enhanced exosome secretion in Down syndrome brain - a protective mechanism to alleviate neuronal endosomal abnormalities. *Acta Neuropathol Commun*, 5, 65.
- GAUTREAU, A., OGUIEVETSKAIA, K. & UNGERMANN, C. 2014. Function and regulation of the endosomal fusion and fission machineries. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.
- GEULA, C., NAGYKERY, N., NICHOLAS, A. & WU, C. K. 2008. Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 309-18.
- GIANNAKOPOULOS, P., HERRMANN, F. R., BUSSIERE, T., BOURAS, C., KOVARI, E., PERL, D. P., MORRISON, J. H., GOLD, G. & HOF, P. R. 2003. Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology*, 60, 1495-500.
- GILLINGHAM, A. K., SINKA, R., TORRES, I. L., LILLEY, K. S. & MUNRO, S. 2014. Toward a comprehensive map of the effectors of rab GTPases. *Dev Cell*, 31, 358-373.
- GILLOOLY, D. J., MORROW, I. C., LINDSAY, M., GOULD, R., BRYANT, N. J., GAULLIER, J. M., PARTON, R. G. & STENMARK, H. 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo j*, 19, 4577-88.
- GINSBERG, S. D., ALLDRED, M. J., COUNTS, S. E., CATALDO, A. M., NEVE, R. L., JIANG, Y., WU, J., CHAO, M. V., MUFSON, E. J., NIXON, R. A. & CHE, S. 2010a. Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry*, 68, 885-93.
- GINSBERG, S. D., MUFSON, E. J., ALLDRED, M. J., COUNTS, S. E., WU, J., NIXON, R. A. & CHE, S. 2011. Upregulation of select rab GTPases in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat*, 42, 102-10.
- GINSBERG, S. D., MUFSON, E. J., COUNTS, S. E., WU, J., ALLDRED, M. J., NIXON, R. A. & CHE, S. 2010b. Regional selectivity of rab5 and rab7 protein upregulation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 22, 631-9.
- GLENNER, G. G. & WONG, C. W. 1984. Alzheimer's disease: initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein. *Biochem Biophys Res Commun*, 120, 885-90.
- GOATE, A. M., HAYNES, A. R., OWEN, M. J., FARRALL, M., JAMES, L. A., LAI, L. Y., MULLAN, M. J., ROQUES, P., ROSSOR, M. N., WILLIAMSON, R. & ET AL. 1989. Predisposing locus for Alzheimer's disease on chromosome 21. *Lancet*, 1, 352-5.
- GOEDERT, M. 2005. Tau gene mutations and their effects. *Mov Disord*, 20 Suppl 12, S45-52.
- GOEDERT, M., SPILLANTINI, M. G., POTIER, M. C., ULRICH, J. & CROWTHER, R. A. 1989. Cloning and sequencing of the cDNA encoding an isoform of microtubule-associated protein tau containing four tandem repeats: differential expression of tau protein mRNAs in human brain. *Embo j*, 8, 393-9.

- GOLDE, T. E., ESTUS, S., YOUNKIN, L. H., SELKOE, D. J. & YOUNKIN, S. G. 1992. Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, 255, 728-30.
- GOLDGABER, D., LERMAN, M. I., MCBRIDE, O. W., SAFFIOTTI, U. & GAJDUSEK, D. C. 1987. Characterization and chromosomal localization of a cDNA encoding brain amyloid of Alzheimer's disease. *Science*, 235, 877-80.
- GOLDSTEIN, J. L., ANDERSON, R. G. & BROWN, M. S. 1979. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature*, 279, 679-85.
- GOMEZ, T. S. & BILLADEAU, D. D. 2009. A FAM21-containing WASH complex regulates retromer-dependent sorting. *Dev Cell*, 17, 699-711.
- GOURAS, G. K., TAMPELLINI, D., TAKAHASHI, R. H. & CAPETILLO-ZARATE, E. 2010. Intraneuronal beta-amyloid accumulation and synapse pathology in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 119, 523-41.
- GRANHOLM, A. C., SANDERS, L. A. & CRNIC, L. S. 2000. Loss of cholinergic phenotype in basal forebrain coincides with cognitive decline in a mouse model of Down's syndrome. *Exp Neurol*, 161, 647-63.
- GRBOVIC, O. M., MATHEWS, P. M., JIANG, Y., SCHMIDT, S. D., DINAKAR, R., SUMMERS-TERIO, N. B., CERESA, B. P., NIXON, R. A. & CATALDO, A. M. 2003. Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and A β production. *J Biol Chem*, 278, 31261-8.
- GRUNDKE-IQBAL, I., IQBAL, K., TUNG, Y. C., QUINLAN, M., WISNIEWSKI, H. M. & BINDER, L. I. 1986. Abnormal phosphorylation of the microtubule-associated protein tau (tau) in Alzheimer cytoskeletal pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 4913-7.
- GUO, S., STOLZ, L. E., LEMROW, S. M. & YORK, J. D. 1999. SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem*, 274, 12990-5.
- HAASS, C., KAETHER, C., THINAKARAN, G. & SISODIA, S. 2012. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a006270.
- HAASS, C., KOO, E. H., MELLON, A., HUNG, A. Y. & SELKOE, D. J. 1992a. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357, 500-3.
- HAASS, C., SCHLOSSMACHER, M. G., HUNG, A. Y., VIGO-PELFREY, C., MELLON, A., OSTASZEWSKI, B. L., LIEBERBURG, I., KOO, E. H., SCHENK, D., TELOW, D. B. & ET AL. 1992b. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature*, 359, 322-5.
- HAASS, C. & SELKOE, D. J. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, 75, 1039-42.
- HAMLETT, E. D., GOETZL, E. J., LEDREUX, A., VASILEVKO, V., BOGER, H. A., LAROSA, A., CLARK, D., CARROLL, S. L., CARMONA-IRAGUI, M., FORTEA, J., MUFSON, E. J., SABBAGH, M., MOHAMMED, A. H., HARTLEY, D., DORAN, E., LOTT, I. T. & GRANHOLM, A. C. 2017. Neuronal exosomes reveal Alzheimer's disease biomarkers in Down syndrome. *Alzheimers Dement*, 13, 541-549.
- HAMLETT, E. D., LEDREUX, A., POTTER, H., CHIAL, H. J., PATTERSON, D., ESPINOSA, J. M., BETTCHER, B. M. & GRANHOLM, A. C. 2018. Exosomal biomarkers in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Free Radic Biol Med*, 114, 110-121.
- HARBOUR, M. E., BREUSEGEM, S. Y., ANTROBUS, R., FREEMAN, C., REID, E. & SEAMAN, M. N. 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci*, 123, 3703-17.
- HARDY, J. A. & HIGGINS, G. A. 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256, 184-5.
- HATTORI, C., ASAI, M., ONISHI, H., SASAGAWA, N., HASHIMOTO, Y., SAIDO, T. C., MARUYAMA, K., MIZUTANI, S. & ISHIURA, S. 2006. BACE1 interacts with lipid raft proteins. *J Neurosci Res*, 84, 912-7.

- HEAD, E., LOTT, I. T., HOF, P. R., BOURAS, C., SU, J. H., KIM, R., HAIER, R. & COTMAN, C. W. 2003. Parallel compensatory and pathological events associated with tau pathology in middle aged individuals with Down syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*, 62, 917-26.
- HEAD, E., LOTT, I. T., WILCOCK, D. M. & LEMERE, C. A. 2016. Aging in Down Syndrome and the Development of Alzheimer's Disease Neuropathology. *Curr Alzheimer Res*, 13, 18-29.
- HEILIGENSTEIN, X., HEILIGENSTEIN, J., DELEVOYE, C., HURBAIN, I., BARDIN, S., PAUL-GILLOTEAUX, P., SENGMANIVONG, L., REGNIER, G., SALAMERO, J., ANTONY, C. & RAPOSO, G. 2014. The CryoCapsule: simplifying correlative light to electron microscopy. *Traffic*, 15, 700-16.
- HEINTZMANN, R. & CREMER, C. G. Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. 1999. 185-196.
- HENNE, W. M., KENT, H. M., FORD, M. G., HEGDE, B. G., DAUMKE, O., BUTLER, P. J., MITTAL, R., LANGEN, R., EVANS, P. R. & MCMAHON, H. T. 2007. Structure and analysis of FCHo2 F-BAR domain: a dimerizing and membrane recruitment module that effects membrane curvature. *Structure*, 15, 839-52.
- HERAULT, Y., DELABAR, J. M., FISHER, E. M. C., TYBULEWICZ, V. L. J., YU, E. & BRAULT, V. 2017. Rodent models in Down syndrome research: impact and future opportunities. *Dis Model Mech*, 10, 1165-1186.
- HERAULT, Y., DUCHON, A., VELOT, E., MARECHAL, D. & BRAULT, V. 2012. The in vivo Down syndrome genomic library in mouse. *Prog Brain Res*, 197, 169-97.
- HERREMAN, A., SERNEELS, L., ANNAERT, W., COLLEN, D., SCHOONJANS, L. & DE STROOPER, B. 2000. Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient embryonic stem cells. *Nat Cell Biol*, 2, 461-2.
- HERVE, D., PORCHE, M., CABREJO, L., GUIDOUX, C., TOURNIER-LASSERVE, E., NICOLAS, G., ADLE-BIASSETTE, H., PLU, I., CHABRIAT, H. & DUYCKAERTS, C. 2018. Fatal Abeta cerebral amyloid angiopathy 4 decades after a dural graft at the age of 2 years. *Acta Neuropathol*, 135, 801-803.
- HOEPFNER, S., SEVERIN, F., CABEZAS, A., HABERMANN, B., RUNGE, A., GILLOOLY, D., STENMARK, H. & ZERIAL, M. 2005. Modulation of receptor recycling and degradation by the endosomal kinesin KIF16B. *Cell*, 121, 437-50.
- HOLTZMAN, D. M., SANTUCCI, D., KILBRIDGE, J., CHUA-COUZENS, J., FONTANA, D. J., DANIELS, S. E., JOHNSON, R. M., CHEN, K., SUN, Y., CARLSON, E., ALLEVA, E., EPSTEIN, C. J. & MOBLEY, W. C. 1996. Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 13333-8.
- HORIUCHI, H., LIPPE, R., MCBRIDE, H. M., RUBINO, M., WOODMAN, P., STENMARK, H., RYBIN, V., WILM, M., ASHMAN, K., MANN, M. & ZERIAL, M. 1997. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*, 90, 1149-59.
- HU, Y. B., DAMMER, E. B., REN, R. J. & WANG, G. 2015. The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener*, 4, 18.
- HUNG, C. O. Y. & LIVESEY, F. J. 2018. Altered gamma-Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease. *Cell Rep*, 25, 3647-3660.e2.
- HUNG, V., UDESHI, N. D., LAM, S. S., LOH, K. H., COX, K. J., PEDRAM, K., CARR, S. A. & TING, A. Y. 2016. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc*, 11, 456-75.
- HUNTER, M. P., NELSON, M., KURZER, M., WANG, X., KRYSCIO, R. J., HEAD, E., PINNA, G. & O'BRYAN, J. P. 2011. Intersectin 1 contributes to phenotypes in vivo: implications for Down's syndrome. *Neuroreport*, 22, 767-72.
- HUNTER, M. P., RUSSO, A. & O'BRYAN, J. P. 2013. Emerging roles for intersectin (ITSN) in regulating signaling and disease pathways. *Int J Mol Sci*, 14, 7829-52.
- HUNYADY, L., BAUKAL, A. J., GABORIK, Z., OLIVARES-REYES, J. A., BOR, M., SZASZAK, M., LODGE, R., CATT, K. J. & BALLA, T. 2002. Differential PI 3-kinase dependence of early

- and late phases of recycling of the internalized AT1 angiotensin receptor. *J Cell Biol*, 157, 1211-22.
- HUO, H. Q., QU, Z. Y., YUAN, F., MA, L., YAO, L., XU, M., HU, Y., JI, J., BHATTACHARYYA, A., ZHANG, S. C. & LIU, Y. 2018. Modeling Down Syndrome with Patient iPSCs Reveals Cellular and Migration Deficits of GABAergic Neurons. *Stem Cell Reports*, 10, 1251-1266.
- HUOTARI, J. & HELENIUS, A. 2011. Endosome maturation. *Embo j*, 30, 3481-500.
- HUSE, J. T., PIJAK, D. S., LESLIE, G. J., LEE, V. M. & DOMS, R. W. 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem*, 275, 33729-37.
- HUSSAIN, N. K., JENNA, S., GLOGAUER, M., QUINN, C. C., WASIAK, S., GUIPPONI, M., ANTONARAKIS, S. E., KAY, B. K., STOSSEL, T. P., LAMARCHE-VANE, N. & MCPHERSON, P. S. 2001. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol*, 3, 927-32.
- HYMAN, B. T., MARZLOFF, K. & ARRIAGADA, P. V. 1993. The lack of accumulation of senile plaques or amyloid burden in Alzheimer's disease suggests a dynamic balance between amyloid deposition and resolution. *J Neuropathol Exp Neurol*, 52, 594-600.
- IHARA, Y., NUKINA, N., MIURA, R. & OGAWARA, M. 1986. Phosphorylated tau protein is integrated into paired helical filaments in Alzheimer's disease. *J Biochem*, 99, 1807-10.
- IKONOMOV, O. C., SBRISIA, D. & SHISHEVA, A. 2001. Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-kinase PIKfyve. *J Biol Chem*, 276, 26141-7.
- IKONOMOV, O. C., SBRISIA, D. & SHISHEVA, A. 2006. Localized PtdIns 3,5-P₂ synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C393-404.
- ILLOUZ, T., MADAR, R., BIRAGYN, A. & OKUN, E. 2019. Restoring microglial and astroglial homeostasis using DNA immunization in a Down Syndrome mouse model. *Brain Behav Immun*, 75, 163-180.
- 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., CARSON, C. T., LAURENT, L. C., MARSALA, M., GAGE, F. H., REMES, A. M., KOO, E. H. & GOLDSTEIN, L. S. 2012. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482, 216-20.
- ITAKURA, E., KISHI, C., INOUE, K. & MIZUSHIMA, N. 2008. Beclin 1 forms two distinct phosphatidylinositol 3-kinase complexes with mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell*, 19, 5360-72.
- IWATSUBO, T., ODAKA, A., SUZUKI, N., MIZUSAWA, H., NUKINA, N. & IHARA, Y. 1994. Visualization of A beta 42(43) and A beta 40 in senile plaques with end-specific A beta monoclonals: evidence that an initially deposited species is A beta 42(43). *Neuron*, 13, 45-53.
- JEFFERIES, H. B., COOKE, F. T., JAT, P., BOUCHERON, C., KOIZUMI, T., HAYAKAWA, M., KAIZAWA, H., OHISHI, T., WORKMAN, P., WATERFIELD, M. D. & PARKER, P. J. 2008. A selective PIKfyve inhibitor blocks PtdIns(3,5)P₂ production and disrupts endomembrane transport and retroviral budding. *EMBO Rep*, 9, 164-70.
- JIANG, Y., MULLANEY, K. A., PETERHOFF, C. M., CHE, S., SCHMIDT, S. D., BOYER-BOITEAU, A., GINSBERG, S. D., CATALDO, A. M., MATHEWS, P. M. & NIXON, R. A. 2010. Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 1630-5.
- JIANG, Y., RIGOGLIOSO, A., PETERHOFF, C. M., PAWLIK, M., SATO, Y., BLEIWAS, C., STAVRIDES, P., SMILEY, J. F., GINSBERG, S. D., MATHEWS, P. M., LEVY, E. & NIXON, R. A. 2016. Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration: role of APP-CTF. *Neurobiol Aging*, 39, 90-8.
- JOHNSON, D. E., OSTROWSKI, P., JAUMOUILLE, V. & GRINSTEIN, S. 2016. The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J Cell Biol*, 212, 677-92.

- JOLY, M., KAZLAUSKAS, A. & CORVERA, S. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required at a postendocytic step in platelet-derived growth factor receptor trafficking. *J Biol Chem*, 270, 13225-30.
- JONES, A. T. & CLAGUE, M. J. 1995. Phosphatidylinositol 3-kinase activity is required for early endosome fusion. *Biochem J*, 311 (Pt 1), 31-4.
- JONSSON, T., ATWAL, J. K., STEINBERG, S., SNAEDAL, J., JONSSON, P. V., BJORNSSON, S., STEFANSSON, H., SULEM, P., GUDBJARTSSON, D., MALONEY, J., HOYTE, K., GUSTAFSON, A., LIU, Y., LU, Y., BHANGALE, T., GRAHAM, R. R., HUTTENLOCHER, J., BJORNSDOTTIR, G., ANDREASSEN, O. A., JONSSON, E. G., PALOTIE, A., BEHRENS, T. W., MAGNUSSON, O. T., KONG, A., THORSTEINSDOTTIR, U., WATTS, R. J. & STEFANSSON, K. 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488, 96-9.
- JOST, M., SIMPSON, F., KAVRAN, J. M., LEMMON, M. A. & SCHMID, S. L. 1998. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol*, 8, 1399-402.
- KAKSONEN, M. & ROUX, A. 2018. Mechanisms of clathrin-mediated endocytosis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 19, 313-326.
- KALAIIDZIDIS, I., MIACZYNSKA, M., BREWINSKA-OLCHOWIK, M., HUPALOWSKA, A., FERGUSON, C., PARTON, R. G., KALAIIDZIDIS, Y. & ZERIAL, M. 2015. APPL endosomes are not obligatory endocytic intermediates but act as stable cargo-sorting compartments. *J Cell Biol*, 211, 123-44.
- KANAI, F., LIU, H., FIELD, S. J., AKBARY, H., MATSUO, T., BROWN, G. E., CANTLEY, L. C. & YAFFE, M. B. 2001. The PX domains of p47phox and p40phox bind to lipid products of PI(3)K. *Nat Cell Biol*, 3, 675-8.
- KANG, E. L., BISCARO, B., PIAZZA, F. & TESCO, G. 2012. BACE1 protein endocytosis and trafficking are differentially regulated by ubiquitination at lysine 501 and the Di-leucine motif in the carboxyl terminus. *J Biol Chem*, 287, 42867-80.
- KANG, E. L., CAMERON, A. N., PIAZZA, F., WALKER, K. R. & TESCO, G. 2010. Ubiquitin regulates GGA3-mediated degradation of BACE1. *J Biol Chem*, 285, 24108-19.
- KANG, J., LEMAIRE, H. G., UNTERBECK, A., SALBAUM, J. M., MASTERS, C. L., GRZESCHIK, K. H., MULTHAUP, G., BEYREUTHER, K. & MULLER-HILL, B. 1987. The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature*, 325, 733-6.
- KARCH, C. M. & GOATE, A. M. 2015. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*, 77, 43-51.
- KARRAN, E., MERCKEN, M. & DE STROOPER, B. 2011. The amyloid cascade hypothesis for Alzheimer's disease: an appraisal for the development of therapeutics. *Nat Rev Drug Discov*, 10, 698-712.
- KATZMANN, D. J., BABST, M. & EMR, S. D. 2001. Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106, 145-55.
- KAUFMAN, S. K., DEL TREDICI, K., THOMAS, T. L., BRAAK, H. & DIAMOND, M. I. 2018. Tau seeding activity begins in the transentorhinal/entorhinal regions and anticipates phospho-tau pathology in Alzheimer's disease and PART. *Acta Neuropathol*, 136, 57-67.
- KELLEY, C. M., POWERS, B. E., VELAZQUEZ, R., ASH, J. A., GINSBERG, S. D., STRUPP, B. J. & MUFSON, E. J. 2014. Sex differences in the cholinergic basal forebrain in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome and Alzheimer's disease. *Brain Pathol*, 24, 33-44.
- KELLY, B. T., GRAHAM, S. C., LISKA, N., DANNHAUSER, P. N., HONING, S., UNGEWICKELL, E. J. & OWEN, D. J. 2014. Clathrin adaptors. AP2 controls clathrin polymerization with a membrane-activated switch. *Science*, 345, 459-63.
- KENNARD, M. L., FELDMAN, H., YAMADA, T. & JEFFERIES, W. A. 1996. Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2, 1230-5.
- KHOSHNOOD, B., GREENLEES, R., LOANE, M. & DOLK, H. 2011. Paper 2: EUROCAT public health indicators for congenital anomalies in Europe. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, 91 Suppl 1, S16-22.

- KIHARA, A., NODA, T., ISHIHARA, N. & OHSUMI, Y. 2001. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy and carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol*, 152, 519-30.
- KIM, G. H., DAYAM, R. M., PRASHAR, A., TEREbiznik, M. & BOTELHO, R. J. 2014. PIKfyve inhibition interferes with phagosome and endosome maturation in macrophages. *Traffic*, 15, 1143-63.
- KIM, S., SATO, Y., MOHAN, P. S., PETERHOFF, C., PENSALFINI, A., RIGOGLIOSO, A., JIANG, Y. & NIXON, R. A. 2016. Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP-betaCTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*, 21, 707-16.
- KIM, W. T., CHANG, S., DANIELL, L., CREMONA, O., DI PAOLO, G. & DE CAMILLI, P. 2002. Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptojanin 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 17143-8.
- KIMURA, R., YAMAMOTO, M., MORIHARA, T., AKATSU, H., KUDO, T., KAMINO, K. & TAKEDA, M. 2009. SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population. *Neurosci Lett*, 461, 177-80.
- KINCHEN, J. M. & RAVICHANDRAN, K. S. 2010. Identification of two evolutionarily conserved genes regulating processing of engulfed apoptotic cells. *Nature*, 464, 778-82.
- KINOSHITA, A., FUKUMOTO, H., SHAH, T., WHELAN, C. M., IRIZARRY, M. C. & HYMAN, B. T. 2003. Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci*, 116, 3339-46.
- KIRCHHAUSEN, T. & HARRISON, S. C. 1981. Protein organization in clathrin trimers. *Cell*, 23, 755-61.
- KIROLA, L., BEHARI, M., SHISHIR, C. & THELMA, B. K. 2016. Identification of a novel homozygous mutation Arg459Pro in SYNJ1 gene of an Indian family with autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*, 31, 124-128.
- KLEIJMEER, M. J., MORKOWSKI, S., GRIFFITH, J. M., RUDENSKY, A. Y. & GEUZE, H. J. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol*, 139, 639-49.
- KLUMPERMAN, J. & RAPOSO, G. 2014. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016857.
- KOBAYASHI, T., BEUCHAT, M. H., CHEVALLIER, J., MAKINO, A., MAYRAN, N., ESCOLA, J. M., LEBRAND, C., COSSON, P., KOBAYASHI, T. & GRUENBERG, J. 2002. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem*, 277, 32157-64.
- KOBAYASHI, T., STANG, E., FANG, K. S., DE MOERLOOSE, P., PARTON, R. G. & GRUENBERG, J. 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*, 392, 193-7.
- KOO, E. H. & SQUAZZO, S. L. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 269, 17386-9.
- KREBS, C. E., KARKHEIRAN, S., POWELL, J. C., CAO, M., MAKAROV, V., DARVISH, H., DI PAOLO, G., WALKER, R. H., SHAHIDI, G. A., BUXBAUM, J. D., DE CAMILLI, P., YUE, Z. & PAISAN-RUIZ, C. 2013. The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat*, 34, 1200-7.
- KUMAR-SINGH, S., THEUNS, J., VAN BROECK, B., PIRICI, D., VENNEKENS, K., CORSMIT, E., CRUTS, M., DERMAUT, B., WANG, R. & VAN BROECKHOVEN, C. 2006. Mean age-of-onset of familial Alzheimer disease caused by presenilin mutations correlates with both increased Abeta42 and decreased Abeta40. *Hum Mutat*, 27, 686-95.
- KURASHIMA, K., SZABO, E. Z., LUKACS, G., ORLOWSKI, J. & GRINSTEIN, S. 1998. Endosomal recycling of the Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 isoform is regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase pathway. *J Biol Chem*, 273, 20828-36.
- KUUSISTO, J., KOIVISTO, K., KERVINEN, K., MYKKANEN, L., HELKALA, E. L., VANHANEN, M., HANNINEN, T., PYORALA, K., KESANIEMI, Y. A., RIEKKINEN, P. & ET AL. 1994. Association of apolipoprotein E phenotypes with late onset Alzheimer's disease: population based study. *Bmj*, 309, 636-8.

- LAFERLA, F. M., GREEN, K. N. & ODDO, S. 2007. Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease. *Nat Rev Neurosci*, 8, 499-509.
- LAGACHE, T., GRASSART, A., DALLONGEVILLE, S., FAKLARIS, O., SAUVONNET, N., DUFOUR, A., DANGLOT, L. & OLIVO-MARIN, J. C. 2018. Mapping molecular assemblies with fluorescence microscopy and object-based spatial statistics. *Nat Commun*, 9, 698.
- LAI, A., SISODIA, S. S. & TROWBRIDGE, I. S. 1995. Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 270, 3565-73.
- 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., RUSSO, G., THORTON-WELLS, T. A., JONES, N., SMITH, A. V., CHOURAKI, V., THOMAS, C., IKRAM, M. A., ZELENIKA, D., VARDARAJAN, B. N., KAMATANI, Y., LIN, C. F., GERRISH, A., SCHMIDT, H., KUNKLE, B., DUNSTAN, M. L., RUIZ, A., BIHOREAU, M. T., CHOI, S. H., REITZ, C., PASQUIER, F., CRUCHAGA, C., CRAIG, D., AMIN, N., BERR, C., LOPEZ, O. L., DE JAGER, P. L., DERAMECOURT, V., JOHNSTON, J. A., EVANS, D., LOVESTONE, S., LETENNEUR, L., MORON, F. J., RUBINSZTEIN, D. C., EIRIKSDOTTIR, G., SLEEGERS, K., GOATE, A. M., FIEVET, N., HUENTELMAN, M. W., GILL, M., BROWN, K., KAMBOH, M. I., KELLER, L., BARBERGER-GATEAU, P., MCGUINNESS, B., LARSON, E. B., GREEN, R., MYERS, A. J., DUFOUIL, C., TODD, S., WALLON, D., LOVE, S., ROGAEVA, E., GALLACHER, J., ST GEORGE-HYSLOP, P., CLARIMON, J., LLEO, A., BAYER, A., TSUANG, D. W., YU, L., TSOLAKI, M., BOSSU, P., SPALLETTA, G., PROITSI, P., COLLINGE, J., SORBI, S., SANCHEZ-GARCIA, F., FOX, N. C., HARDY, J., DENIZ NARANJO, M. C., BOSCO, P., CLARKE, R., BRAYNE, C., GALIMBERTI, D., MANCUSO, M., MATTHEWS, F., MOEBUS, S., MECOCCHI, P., DEL ZOMPO, M., MAIER, W., HAMPEL, H., PILOTTO, A., BULLIDO, M., PANZA, F., CAFFARRA, P., NACMIAS, B., GILBERT, J. R., MAYHAUS, M., LANNEFELT, L., HAKONARSON, H., PICHLER, S., et al. 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 45, 1452-8.
- LAMBERT, M. P., BARLOW, A. K., CHROMY, B. A., EDWARDS, C., FREED, R., LIOSATOS, M., MORGAN, T. E., ROZOVSKY, I., TROMMER, B., VIOLA, K. L., WALS, P., ZHANG, C., FINCH, C. E., KRAFFT, G. A. & KLEIN, W. L. 1998. Diffusible, nonfibrillar ligands derived from Abeta1-42 are potent central nervous system neurotoxins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 6448-53.
- LANGUI, D., GIRARDOT, N., EL HACHIMI, K. H., ALLINQUANT, B., BLANCHARD, V., PRADIER, L. & DUYCKAERTS, C. 2004. Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am J Pathol*, 165, 1465-77.
- LAURITZEN, I., PARDOSSI-PIQUARD, R., BAUER, C., BRIGHAM, E., ABRAHAM, J. D., RANALDI, S., FRASER, P., ST-GEORGE-HYSLOP, P., LE THUC, O., ESPIN, V., CHAMI, L., DUNYS, J. & CHECLER, F. 2012. The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci*, 32, 16243-1655a.
- LAURITZEN, I., PARDOSSI-PIQUARD, R., BOURGEOIS, A., PAGNOTTA, S., BIFERI, M. G., BARKATS, M., LACOR, P., KLEIN, W., BAUER, C. & CHECLER, F. 2016. Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol*, 132, 257-76.
- LAW, F., SEO, J. H., WANG, Z., DELEON, J. L., BOLIS, Y., BROWN, A., ZONG, W. X., DU, G. & ROCHELEAU, C. E. 2017. The VPS34 PI3K negatively regulates RAB-5 during endosome maturation. *J Cell Sci*, 130, 2007-2017.
- LAW, D. C., CHAWLA, A., MERITHEW, E., DUMAS, J., CARRINGTON, W., FOGARTY, K., LIFSHITZ, L., TUFT, R., LAMBRIGHT, D. & CORVERA, S. 2002. Sequential roles for phosphatidylinositol 3-phosphate and Rab5 in tethering and fusion of early endosomes via their interaction with EEA1. *J Biol Chem*, 277, 8611-7.
- LAW, D. C., PATKI, V., HELLER-HARRISON, R., LAMBRIGHT, D. & CORVERA, S. 2000. The FYVE domain of early endosome antigen 1 is required for both phosphatidylinositol 3-

- phosphate and Rab5 binding. Critical role of this dual interaction for endosomal localization. *J Biol Chem*, 275, 3699-705.
- LEE, J. H., MCBRAYER, M. K., WOLFE, D. M., HASLETT, L. J., KUMAR, A., SATO, Y., LIE, P. P., MOHAN, P., COFFEY, E. E., KOMPPELLA, U., MITCHELL, C. H., LLOYD-EVANS, E. & NIXON, R. A. 2015. Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. *Cell Rep*, 12, 1430-44.
- LEE, J. H., YU, W. H., KUMAR, A., LEE, S., MOHAN, P. S., PETERHOFF, C. M., WOLFE, D. M., MARTINEZ-VICENTE, M., MASSEY, A. C., SOVAK, G., UCHIYAMA, Y., WESTAWAY, D., CUERVO, A. M. & NIXON, R. A. 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141, 1146-58.
- LEHERICY, S., HIRSCH, E. C., CERVERA, P., HERSH, L. B., HAUW, J. J., RUBERG, M. & AGID, Y. 1989. Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 8580-4.
- LEJEUNE, J., GAUTIER, M. & TURPIN, R. 1959. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 248, 1721-2.
- LESNE, S., KOH, M. T., KOTILINEK, L., KAYED, R., GLABE, C. G., YANG, A., GALLAGHER, M. & ASHE, K. H. 2006. A specific amyloid-beta protein assembly in the brain impairs memory. *Nature*, 440, 352-7.
- LETOURNEUR, F. & KLAUSNER, R. D. 1992. A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains. *Cell*, 69, 1143-57.
- LEVERENZ, J. B. & RASKIND, M. A. 1998. Early amyloid deposition in the medial temporal lobe of young Down syndrome patients: a regional quantitative analysis. *Exp Neurol*, 150, 296-304.
- LEWIS, M. J., NICHOLS, B. J., PRESCIANTO-BASCHONG, C., RIEZMAN, H. & PELHAM, H. R. 2000. Specific retrieval of the exocytic SNARE Snc1p from early yeast endosomes. *Mol Biol Cell*, 11, 23-38.
- LI, G., D'SOUZA-SCHOREY, C., BARBIERI, M. A., ROBERTS, R. L., KLIPPEL, A., WILLIAMS, L. T. & STAHL, P. D. 1995. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10207-11.
- LINDWALL, G. & COLE, R. D. 1984. Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem*, 259, 5301-5.
- LIPPE, R., MIACZYNSKA, M., RYBIN, V., RUNGE, A. & ZERIAL, M. 2001. Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell*, 12, 2219-28.
- LIU, T. T., GOMEZ, T. S., SACKKEY, B. K., BILLADEAU, D. D. & BURD, C. G. 2012. Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell*, 23, 2505-15.
- LOBINGIER, B. T., HUTTENHAIN, R., EICHEL, K., MILLER, K. B., TING, A. Y., VON ZASTROW, M. & KROGAN, N. J. 2017. An Approach to Spatiotemporally Resolve Protein Interaction Networks in Living Cells. *Cell*, 169, 350-360.e12.
- LOTT, I. T. & HEAD, E. 2019. Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. *Nat Rev Neurol*.
- MANI, M., LEE, S. Y., LUCAST, L., CREMONA, O., DI PAOLO, G., DE CAMILLI, P. & RYAN, T. A. 2007. The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron*, 56, 1004-18.
- MANN, D. M. & ESIRI, M. M. 1989. The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci*, 89, 169-79.
- MANN, D. M. A., DAVIDSON, Y. S., ROBINSON, A. C., ALLEN, N., HASHIMOTO, T., RICHARDSON, A., JONES, M., SNOWDEN, J. S., PENDLETON, N., POTIER, M. C., LAQUERRIERE, A., PRASHER, V., IWATSUBO, T. & STRYDOM, A. 2018. Patterns and severity of vascular amyloid in Alzheimer's disease associated with duplications and missense mutations in APP gene, Down syndrome and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*, 136, 569-587.
- MAPSTONE, M., CHEEMA, A. K., FIANDACA, M. S., ZHONG, X., MHYRE, T. R., MACARTHUR, L. H., HALL, W. J., FISHER, S. G., PETERSON, D. R., HALEY, J. M.,

- NAZAR, M. D., RICH, S. A., BERLAU, D. J., PELTZ, C. B., TAN, M. T., KAWAS, C. H. & FEDEROFF, H. J. 2014. Plasma phospholipids identify antecedent memory impairment in older adults. *Nat Med*, 20, 415-8.
- MARQUER, C., DEVAUGES, V., COSSEC, J. C., LIOT, G., LECART, S., SAUDOU, F., DUYCKAERTS, C., LEVEQUE-FORT, S. & POTIER, M. C. 2011. Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J*, 25, 1295-305.
- MARQUER, C., LAINE, J., DAUPHINOT, L., HANBOUCH, L., LEMERCIER-NEUILLET, C., PIERROT, N., BOSSERS, K., LE, M., CORLIER, F., BENSTAALI, C., SAUDOU, F., THINAKARAN, G., CARTIER, N., OCTAVE, J. N., DUYCKAERTS, C. & POTIER, M. C. 2014. Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Mol Neurodegener*, 9, 60.
- MARTIN, N. P., MOHNEY, R. P., DUNN, S., DAS, M., SCAPPINI, E. & O'BRYAN, J. P. 2006. Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Mol Pharmacol*, 70, 1643-53.
- MARTIN, S. B., DOWLING, A. L., LIANEKHAMMY, J., LOTT, I. T., DORAN, E., MURPHY, M. P., BECKETT, T. L., SCHMITT, F. A. & HEAD, E. 2014. Synaptophysin and synaptojanin-1 in Down syndrome are differentially affected by Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 42, 767-75.
- MAXFIELD, F. R. & MCGRAW, T. E. 2004. Endocytic recycling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 121-32.
- MCCARTNEY, A. J., ZHANG, Y. & WEISMAN, L. S. 2014. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance. *Bioessays*, 36, 52-64.
- MCGAVIN, M. K., BADOUR, K., HARDY, L. A., KUBISESKI, T. J., ZHANG, J. & SIMINOVITCH, K. A. 2001. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASP)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J Exp Med*, 194, 1777-87.
- MCINTIRE, L. B., BERMAN, D. E., MYAENG, J., STANISZEWSKI, A., ARANCIO, O., DI PAOLO, G. & KIM, T. W. 2012. Reduction of synaptojanin 1 ameliorates synaptic and behavioral impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 32, 15271-6.
- MCPHERSON, P. S., GARCIA, E. P., SLEPNEV, V. I., DAVID, C., ZHANG, X., GRABS, D., SOSSIN, W. S., BAUERFEIND, R., NEMOTO, Y. & DE CAMILLI, P. 1996. A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, 379, 353-7.
- MERRIFIELD, C. J., QUALMANN, B., KESSELS, M. M. & ALMERS, W. 2004. Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 83, 13-8.
- MIACZYNSKA, M., CHRISTOFORIDIS, S., GINER, A., SHEVCHENKO, A., UTTENWEILER-JOSEPH, S., HABERMANN, B., WILM, M., PARTON, R. G. & ZERIAL, M. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*, 116, 445-56.
- MILLER, C. C., MCLOUGHLIN, D. M., LAU, K. F., TENNANT, M. E. & ROGELJ, B. 2006. The X11 proteins, Abeta production and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 29, 280-5.
- MILLER, K., BEARDMORE, J., KANETY, H., SCHLESSINGER, J. & HOPKINS, C. R. 1986. Localization of the epidermal growth factor (EGF) receptor within the endosome of EGF-stimulated epidermoid carcinoma (A431) cells. *J Cell Biol*, 102, 500-9.
- MILLER, S. E., MATHIASSEN, S., BRIGHT, N. A., PIERRE, F., KELLY, B. T., KLADT, N., SCHAUSS, A., MERRIFIELD, C. J., STAMOU, D., HONING, S. & OWEN, D. J. 2015. CALM regulates clathrin-coated vesicle size and maturation by directly sensing and driving membrane curvature. *Dev Cell*, 33, 163-75.
- MINDELL, J. A. 2012. Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol*, 74, 69-86.
- MIRANDA, A. M., HERMAN, M., CHENG, R., NAHMANI, E., BARRETT, G., MICEVSKA, E., FONTAINE, G., POTIER, M. C., HEAD, E., SCHMITT, F. A., LOTT, I. T., JIMENEZ-VELAZQUEZ, I. Z., ANTONARAKIS, S. E., DI PAOLO, G., LEE, J. H., HUSSAINI, S. A. & MARQUER, C. 2018. Excess Synaptojanin 1 Contributes to Place Cell Dysfunction and Memory Deficits in the Aging Hippocampus in Three Types of Alzheimer's Disease. *Cell Rep*, 23, 2967-2975.

- MOREL, E., CHAMOUN, Z., LASIECKA, Z. M., CHAN, R. B., WILLIAMSON, R. L., VETANOVETZ, C., DALL'ARMI, C., SIMOES, S., POINT DU JOUR, K. S., MCCABE, B. D., SMALL, S. A. & DI PAOLO, G. 2013. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nat Commun*, 4, 2250.
- MORRIS, G. P., CLARK, I. A. & VISSEL, B. 2014. Inconsistencies and controversies surrounding the amyloid hypothesis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol Commun*, 2, 135.
- MULLER, U. C. & ZHENG, H. 2012. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a006288.
- MURK, J. L., POSTHUMA, G., KOSTER, A. J., GEUZE, H. J., VERKLEIJ, A. J., KLEIJMEER, M. J. & HUMBEL, B. M. 2003. Influence of aldehyde fixation on the morphology of endosomes and lysosomes: quantitative analysis and electron tomography. *J Microsc*, 212, 81-90.
- MURRAY, A., LETOURNEAU, A., CANZONETTA, C., STATHAKI, E., GIMELLI, S., SLOAN-BENA, F., ABREHART, R., GOH, P., LIM, S., BALDO, C., DAGNA-BRICARELLI, F., HANNAN, S., MORTENSEN, M., BALLARD, D., SYNDERCOMBE COURT, D., FUSAKI, N., HASEGAWA, M., SMART, T. G., BISHOP, C., ANTONARAKIS, S. E., GROET, J. & NIZETIC, D. 2015. Brief report: isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells*, 33, 2077-84.
- MURRAY, D. H., JAHNEL, M., LAUER, J., AVELLANEDA, M. J., BROUILLY, N., CEZANNE, A., MORALES-NAVARRETE, H., PERINI, E. D., FERGUSON, C., LUPAS, A. N., KALAIIDZIDIS, Y., PARTON, R. G., GRILL, S. W. & ZERIAL, M. 2016. An endosomal tether undergoes an entropic collapse to bring vesicles together. *Nature*, 537, 107-111.
- NAKANISHI, S., CATT, K. J. & BALLA, T. 1995. A wortmannin-sensitive phosphatidylinositol 4-kinase that regulates hormone-sensitive pools of inositolphospholipids. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 5317-21.
- NEEFJES, J. & VAN DER KANT, R. 2014. Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system. *Trends Neurosci*, 37, 66-76.
- NEMOTO, Y., KEARNS, B. G., WENK, M. R., CHEN, H., MORI, K., ALB, J. G., JR., DE CAMILLI, P. & BANKAITIS, V. A. 2000. Functional characterization of a mammalian Sac1 and mutants exhibiting substrate-specific defects in phosphoinositide phosphatase activity. *J Biol Chem*, 275, 34293-305.
- NETZER, W. J., POWELL, C., NONG, Y., BLUNDELL, J., WONG, L., DUFF, K., FLAJOLET, M. & GREENGARD, P. 2010. Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. *PLoS One*, 5, e10943.
- NIELSEN, E., CHRISTOFORIDIS, S., UTTEWEILER-JOSEPH, S., MIACZYNSKA, M., DEWITTE, F., WILM, M., HOFLACK, B. & ZERIAL, M. 2000. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol*, 151, 601-12.
- NIELSEN, E., SEVERIN, F., BACKER, J. M., HYMAN, A. A. & ZERIAL, M. 1999. Rab5 regulates motility of early endosomes on microtubules. *Nat Cell Biol*, 1, 376-82.
- NISHIKAWA, T., TAKAHASHI, T., NAKAMORI, M., YAMAZAKI, Y., KURASHIGE, T., NAGANO, Y., NISHIDA, Y., IZUMI, Y. & MATSUMOTO, M. 2014. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is enriched in granulovacuolar degeneration bodies and neurofibrillary tangles. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40, 489-501.
- NIXON, R. A. 2017. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *Faseb j*, 31, 2729-2743.
- NORDMANN, M., CABRERA, M., PERZ, A., BROCKER, C., OSTROWICZ, C., ENGELBRECHT-VANDRE, S. & UNGERMANN, C. 2010. The Mon1-Ccz1 complex is the GEF of the late endosomal Rab7 homolog Ypt7. *Curr Biol*, 20, 1654-9.
- NORDSTEDT, C., CAPORASO, G. L., THYBERG, J., GANDY, S. E. & GREENGARD, P. 1993. Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. *J Biol Chem*, 268, 608-12.

- OKAMOTO, M., SCHOCH, S. & SUDHOF, T. C. 1999. EHS1/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, 18446-54.
- OLGIATI, S., DE ROSA, A., QUADRI, M., CRISCUOLO, C., BREEDVELD, G. J., PICILLO, M., PAPPATA, S., QUARANTELLI, M., BARONE, P., DE MICHELE, G. & BONIFATI, V. 2014. PARK2 caused by SYNJ1 homozygous Arg258Gln mutation in a new Italian family. *Neurogenetics*, 15, 183-8.
- PALFY, M., REMENYI, A. & KORCSMAROS, T. 2012. Endosomal crosstalk: meeting points for signaling pathways. *Trends Cell Biol*, 22, 447-56.
- PATKI, V., LAWE, D. C., CORVERA, S., VIRBASIS, J. V. & CHAWLA, A. 1998. A functional PtdIns(3)P-binding motif. *Nature*, 394, 433-4.
- PEACOCK, M. L., WARREN, J. T., JR., ROSES, A. D. & FINK, J. K. 1993. Novel polymorphism in the A4 region of the amyloid precursor protein gene in a patient without Alzheimer's disease. *Neurology*, 43, 1254-6.
- PEARSE, B. M. 1975. Coated vesicles from pig brain: purification and biochemical characterization. *J Mol Biol*, 97, 93-8.
- PECHSTEIN, A., BACETIC, J., VAHEDI-FARIDI, A., GROMOVA, K., SUNDBORGER, A., TOMLIN, N., KRAINER, G., VORONTOVA, O., SCHAFER, J. G., OWE, S. G., COUSIN, M. A., SAENGER, W., SHUPLIAKOV, O. & HAUCKE, V. 2010. Regulation of synaptic vesicle recycling by complex formation between intersectin 1 and the clathrin adaptor complex AP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4206-11.
- PEREZ, R. G., SORIANO, S., HAYES, J. D., OSTASZEWSKI, B., XIA, W., SELKOE, D. J., CHEN, X., STOKIN, G. B. & KOO, E. H. 1999. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem*, 274, 18851-6.
- PERINI, E. D., SCHAEFER, R., STOTER, M., KALAIIDZIDIS, Y. & ZERIAL, M. 2014. Mammalian CORVET is required for fusion and conversion of distinct early endosome subpopulations. *Traffic*, 15, 1366-89.
- PILLAY, C. S., ELLIOTT, E. & DENNISON, C. 2002. Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J*, 363, 417-29.
- PORTELIUS, E., SOININEN, H., ANDREASSON, U., ZETTERBERG, H., PERSSON, R., KARLSSON, G., BLENNOW, K., HERUKKA, S. K. & MATTSSON, N. 2014. Exploring Alzheimer molecular pathology in Down's syndrome cerebrospinal fluid. *Neurodegener Dis*, 14, 98-106.
- POTERYAEV, D., DATTA, S., ACKEMA, K., ZERIAL, M. & SPANG, A. 2010. Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell*, 141, 497-508.
- POTTER, R., PATTERSON, B. W., ELBERT, D. L., OVOD, V., KASTEN, T., SIGURDSON, W., MAWUENYEGA, K., BLAZEY, T., GOATE, A., CHOTT, R., YARASHESKI, K. E., HOLTZMAN, D. M., MORRIS, J. C., BENZINGER, T. L. & BATEMAN, R. J. 2013. Increased in vivo amyloid-beta42 production, exchange, and loss in presenilin mutation carriers. *Sci Transl Med*, 5, 189ra77.
- PRABHU, Y., BURGOS, P. V., SCHINDLER, C., FARIAS, G. G., MAGADAN, J. G. & BONIFACINO, J. S. 2012. Adaptor protein 2-mediated endocytosis of the beta-secretase BACE1 is dispensable for amyloid precursor protein processing. *Mol Biol Cell*, 23, 2339-51.
- PRASHER, V. P., FARRER, M. J., KESSLING, A. M., FISHER, E. M., WEST, R. J., BARBER, P. C. & BUTLER, A. C. 1998. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol*, 43, 380-3.
- PREDESCU, S. A., PREDESCU, D. N., TIMBLIN, B. K., STAN, R. V. & MALIK, A. B. 2003. Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 14, 4997-5010.
- PROKIC, I., COWLING, B. S. & LAPORTE, J. 2014. Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med (Berl)*, 92, 453-63.

- PRYOR, P. R., MULLOCK, B. M., BRIGHT, N. A., GRAY, S. R. & LUZIO, J. P. 2000. The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J Cell Biol*, 149, 1053-62.
- PUCHARCOS, C., FUENTES, J. J., CASAS, C., DE LA LUNA, S., ALCANTARA, S., ARBONES, M. L., SORIANO, E., ESTIVILL, X. & PRITCHARD, M. 1999. Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome. *Eur J Hum Genet*, 7, 704-12.
- QUADRI, M., FANG, M., PICILLO, M., OLGATI, S., BREEDVELD, G. J., GRAAFLAND, J., WU, B., XU, F., ERRO, R., AMBONI, M., PAPPATA, S., QUARANTELLI, M., ANNESI, G., QUATTRONE, A., CHIEN, H. F., BARBOSA, E. R., OOSTRA, B. A., BARONE, P., WANG, J. & BONIFATI, V. 2013. Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat*, 34, 1208-15.
- RAFII, M. S., LUKIC, A. S., ANDREWS, R. D., BREWER, J., RISSMAN, R. A., STROTHER, S. C., WERNICK, M. N., PENNINGTON, C., MOBLEY, W. C., NESS, S. & MATTHEWS, D. C. 2017. PET Imaging of Tau Pathology and Relationship to Amyloid, Longitudinal MRI, and Cognitive Change in Down Syndrome: Results from the Down Syndrome Biomarker Initiative (DSBI). *J Alzheimers Dis*, 60, 439-450.
- RAIBORG, C., BREMNES, B., MEHLUM, A., GILLOOLY, D. J., D'ARRIGO, A., STANG, E. & STENMARK, H. 2001. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci*, 114, 2255-63.
- RAJA, W. K., MUNGENAST, A. E., LIN, Y. T., KO, T., ABDURROB, F., SEO, J. & TSAI, L. H. 2016. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One*, 11, e0161969.
- RAMANATHAN, H. N. & YE, Y. 2012. The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes. *Cell Res*, 22, 346-59.
- RAMJAUN, A. R. & MCPHERSON, P. S. 1996. Tissue-specific alternative splicing generates two synaptojanin isoforms with differential membrane binding properties. *J Biol Chem*, 271, 24856-61.
- RAMJAUN, A. R. & MCPHERSON, P. S. 1998. Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem*, 70, 2369-76.
- REEVES, R. H., IRVING, N. G., MORAN, T. H., WOHN, A., KITT, C., SISODIA, S. S., SCHMIDT, C., BRONSON, R. T. & DAVISSON, M. T. 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet*, 11, 177-84.
- RICCIARELLI, R. & FEDELE, E. 2017. The Amyloid Cascade Hypothesis in Alzheimer's Disease: It's Time to Change Our Mind. *Curr Neuroparmacol*, 15, 926-935.
- RINK, J., GHIGO, E., KALAZIDIS, Y. & ZERIAL, M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-49.
- ROBERTS, R. L., BARBIERI, M. A., PRYSE, K. M., CHUA, M., MORISAKI, J. H. & STAHL, P. D. 1999. Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J Cell Sci*, 112 (Pt 21), 3667-75.
- ROGAEVA, E., MENG, Y., LEE, J. H., GU, Y., KAWARAI, T., ZOU, F., KATAYAMA, T., BALDWIN, C. T., CHENG, R., HASEGAWA, H., CHEN, F., SHIBATA, N., LUNETTA, K. L., PARDOSSI-PIQUARD, R., BOHM, C., WAKUTANI, Y., CUPPLES, L. A., CUENCO, K. T., GREEN, R. C., PINESSI, L., RAINERO, I., SORBI, S., BRUNI, A., DUARA, R., FRIEDLAND, R. P., INZELBERG, R., HAMPE, W., BUJO, H., SONG, Y. Q., ANDERSEN, O. M., WILLNOW, T. E., GRAFF-RADFORD, N., PETERSEN, R. C., DICKSON, D., DER, S. D., FRASER, P. E., SCHMITT-ULMS, G., YOUNKIN, S., MAYEUX, R., FARRER, L. A. & ST GEORGE-HYSLOP, P. 2007. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 39, 168-77.
- ROJAS, R., VAN VLIJMEN, T., MARDONES, G. A., PRABHU, Y., ROJAS, A. L., MOHAMMED, S., HECK, A. J., RAPOSO, G., VAN DER SLUIJS, P. & BONIFACINO, J. S. 2008. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol*, 183, 513-26.

- ROSENDALE, M. & PERRAIS, D. 2017. Imaging in focus: Imaging the dynamics of endocytosis. *Int J Biochem Cell Biol*, 93, 41-45.
- ROTH, T. F. & PORTER, K. R. 1964. YOLK PROTEIN UPTAKE IN THE OOCYTE OF THE MOSQUITO AEDES AEGYPTI. L. *J Cell Biol*, 20, 313-32.
- ROVELET-LECRUX, A., HANNEQUIN, D., RAUX, G., LE MEUR, N., LAQUERRIERE, A., VITAL, A., DUMANCHIN, C., FEUILLETTE, S., BRICE, A., VERCELLETTO, M., DUBAS, F., FREBOURG, T. & CAMPION, D. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*, 38, 24-6.
- ROZELLE, A. L., MACHESKY, L. M., YAMAMOTO, M., DRIESSENS, M. H., INSALL, R. H., ROTH, M. G., LUBY-PHELPS, K., MARRIOTT, G., HALL, A. & YIN, H. L. 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol*, 10, 311-20.
- RUBINO, M., MIACZYNSKA, M., LIPPE, R. & ZERIAL, M. 2000. Selective membrane recruitment of EEA1 suggests a role in directional transport of clathrin-coated vesicles to early endosomes. *J Biol Chem*, 275, 3745-8.
- RUTHERFORD, A. C., TRAER, C., WASSMER, T., PATNI, K., BUJNY, M. V., CARLTON, J. G., STENMARK, H. & CULLEN, P. J. 2006. The mammalian phosphatidylinositol 3-phosphate 5-kinase (PIKfyve) regulates endosome-to-TGN retrograde transport. *J Cell Sci*, 119, 3944-57.
- SABBAGH, M. N., CHEN, K., ROGERS, J., FLEISHER, A. S., LIEBSACK, C., BANDY, D., BELDEN, C., PROTAS, H., THIYYAGURA, P., LIU, X., ROONTIVA, A., LUO, J., JACOBSON, S., MALEK-AHMADI, M., POWELL, J. & REIMAN, E. M. 2015. Florbetapir PET, FDG PET, and MRI in Down syndrome individuals with and without Alzheimer's dementia. *Alzheimers Dement*, 11, 994-1004.
- SALEHI, A., DELCROIX, J. D., BELICHENKO, P. V., ZHAN, K., WU, C., VALLETTA, J. S., TAKIMOTO-KIMURA, R., KLESCHEVNIKOV, A. M., SAMBAMURTI, K., CHUNG, P. P., XIA, W., VILLAR, A., CAMPBELL, W. A., KULNANE, L. S., NIXON, R. A., LAMB, B. T., EPSTEIN, C. J., STOKIN, G. B., GOLDSTEIN, L. S. & MOBLEY, W. C. 2006. Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron*, 51, 29-42.
- SARDAR SINHA, M., ANSELL-SCHULTZ, A., CIVITELLI, L., HILDESJO, C., LARSSON, M., LANNFELT, L., INGELSSON, M. & HALLBECK, M. 2018. Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers. *Acta Neuropathol*, 136, 41-56.
- SAUNDERS, A. M., STRITTMATTER, W. J., SCHMECHEL, D., GEORGE-HYSLOP, P. H., PERICAK-VANCE, M. A., JOO, S. H., ROSI, B. L., GUSELLA, J. F., CRAPPER-MACLACHLAN, D. R., ALBERTS, M. J. & ET AL. 1993. Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology*, 43, 1467-72.
- SBRISSA, D., IKONOMOV, O. C., FU, Z., IJIN, T., GRUENBERG, J., TAKENAWA, T. & SHISHEVA, A. 2007. Core protein machinery for mammalian phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate synthesis and turnover that regulates the progression of endosomal transport. Novel Sac phosphatase joins the ArPIKfyve-PIKfyve complex. *J Biol Chem*, 282, 23878-91.
- SBRISSA, D., IKONOMOV, O. C. & SHISHEVA, A. 2002. Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization. *J Biol Chem*, 277, 6073-9.
- SCHERZER, C. R., OFFE, K., GEARING, M., REES, H. D., FANG, G., HEILMAN, C. J., SCHALLER, C., BUJO, H., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2004. Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 61, 1200-5.
- SCHEUNER, D., ECKMAN, C., JENSEN, M., SONG, X., CITRON, M., SUZUKI, N., BIRD, T. D., HARDY, J., HUTTON, M., KUKULL, W., LARSON, E., LEVY-LAHAD, E., VIITANEN, M., PESKIND, E., POORKAJ, P., SCHELLENBERG, G., TANZI, R., WASCO, W., LANNFELT, L., SELKOE, D. & YOUNKIN, S. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar

- to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 and 2 and APP mutations linked to familial Alzheimer's disease. *Nat Med*, 2, 864-70.
- SCHINK, K. O., TAN, K. W. & STENMARK, H. 2016. Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 32, 143-171.
- SCHLOSSMAN, D. M., SCHMID, S. L., BRAELL, W. A. & ROTHMAN, J. E. 1984. An enzyme that removes clathrin coats: purification of an uncoating ATPase. *J Cell Biol*, 99, 723-33.
- SCHWAGERL, A. L., MOHAN, P. S., CATALDO, A. M., VONSATTEL, J. P., KOWALL, N. W. & NIXON, R. A. 1995. Elevated levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid in Alzheimer disease. *J Neurochem*, 64, 443-6.
- SEABROOK, G. R., SMITH, D. W., BOWERY, B. J., EASTER, A., REYNOLDS, T., FITZJOHN, S. M., MORTON, R. A., ZHENG, H., DAWSON, G. R., SIRINATHSINGHI, D. J., DAVIES, C. H., COLLINGRIDGE, G. L. & HILL, R. G. 1999. Mechanisms contributing to the deficits in hippocampal synaptic plasticity in mice lacking amyloid precursor protein. *Neuropharmacology*, 38, 349-59.
- SEALS, D. F., EITZEN, G., MARGOLIS, N., WICKNER, W. T. & PRICE, A. 2000. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9402-7.
- SEAMAN, M. N., GAUTREAU, A. & BILLADEAU, D. D. 2013. Retromer-mediated endosomal protein sorting: all WASHed up! *Trends Cell Biol*, 23, 522-8.
- SEAMAN, M. N., MCCAFFERY, J. M. & EMR, S. D. 1998. A membrane coat complex essential for endosome-to-Golgi retrograde transport in yeast. *J Cell Biol*, 142, 665-81.
- SELKOE, D. J. & HARDY, J. 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med*, 8, 595-608.
- SEMERDJIEVA, S., SHORTT, B., MAXWELL, E., SINGH, S., FONAREV, P., HANSEN, J., SCHIAVO, G., GRANT, B. D. & SMYTHE, E. 2008. Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol*, 183, 499-511.
- SEO, H. & ISACSON, O. 2005. Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp Neurol*, 193, 469-80.
- SEPULVEDA, F. E., MASCHALIDI, S., COLISSON, R., HESLOP, L., GHIRELLI, C., SAKKA, E., LENNON-DUMENIL, A. M., AMIGORENA, S., CABANIE, L. & MANOURY, B. 2009. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity*, 31, 737-48.
- SEZGIN, E., LEVENTAL, I., MAYOR, S. & EGGELING, C. 2017. The mystery of membrane organization: composition, regulation and roles of lipid rafts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 18, 361-374.
- SHAO, L., KNER, P., REGO, E. H. & GUSTAFSSON, M. G. 2011. Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination. *Nat Methods*, 8, 1044-6.
- SHEEHAN, R., SINAI, A., BASS, N., BLATCHFORD, P., BOHNEN, I., BONELL, S., COURTENAY, K., HASSIOTIS, A., MARKAR, T., MCCARTHY, J., MUKHERJI, K., NAEEM, A., PASCHOS, D., PEREZ-ACHIAGA, N., SHARMA, V., THOMAS, D., WALKER, Z. & STRYDOM, A. 2015. Dementia diagnostic criteria in Down syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry*, 30, 857-63.
- SHI, Y., KIRWAN, P., SMITH, J., MACLEAN, G., ORKIN, S. H. & LIVESEY, F. J. 2012. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med*, 4, 124ra29.
- SHIN, H. W., HAYASHI, M., CHRISTOFORIDIS, S., LACAS-GERVAIS, S., HOEPFNER, S., WENK, M. R., MODREGGER, J., UTENWEILER-JOSEPH, S., WILM, M., NYSTUEN, A., FRANKEL, W. N., SOLIMENA, M., DE CAMILLI, P. & ZERIAL, M. 2005. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol*, 170, 607-18.
- SHISHEVA, A. 2012. PIKfyve and its Lipid products in health and in sickness. *Curr Top Microbiol Immunol*, 362, 127-62.

- SHOJI, M., GOLDE, T. E., GHISO, J., CHEUNG, T. T., ESTUS, S., SHAFFER, L. M., CAI, X. D., MCKAY, D. M., TINTNER, R., FRANGIONE, B. & ET AL. 1992. Production of the Alzheimer amyloid beta protein by normal proteolytic processing. *Science*, 258, 126-9.
- SHPETNER, H., JOLY, M., HARTLEY, D. & CORVERA, S. 1996. Potential sites of PI-3 kinase function in the endocytic pathway revealed by the PI-3 kinase inhibitor, wortmannin. *J Cell Biol*, 132, 595-605.
- SIMONSEN, A., LIPPE, R., CHRISTOFORIDIS, S., GAULLIER, J. M., BRECH, A., CALLAGHAN, J., TOH, B. H., MURPHY, C., ZERIAL, M. & STENMARK, H. 1998. EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature*, 394, 494-8.
- SINHA, S., ANDERSON, J. P., BARBOUR, R., BASI, G. S., CACCAVELLO, R., DAVIS, D., DOAN, M., DOVEY, H. F., FRIGON, N., HONG, J., JACOBSON-CROAK, K., JEWETT, N., KEIM, P., KNOPS, J., LIEBERBURG, I., POWER, M., TAN, H., TATSUNO, G., TUNG, J., SCHENK, D., SEUBERT, P., SUOMENSAARI, S. M., WANG, S., WALKER, D., ZHAO, J., MCCONLOGUE, L. & JOHN, V. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, 402, 537-40.
- SISODIA, S. S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6075-9.
- SISODIA, S. S., KOO, E. H., BEYREUTHER, K., UNTERBECK, A. & PRICE, D. L. 1990. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*, 248, 492-5.
- SISODIA, S. S., KOO, E. H., HOFFMAN, P. N., PERRY, G. & PRICE, D. L. 1993. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci*, 13, 3136-42.
- SLEEGERS, K., BROUWERS, N., GIJSELINCK, I., THEUNS, J., GOOSSENS, D., WAUTERS, J., DEL-FAVERO, J., CRUTS, M., VAN DUJIN, C. M. & VAN BROECKHOVEN, C. 2006. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*, 129, 2977-83.
- SMALL, S. A., KENT, K., PIERCE, A., LEUNG, C., KANG, M. S., OKADA, H., HONIG, L., VONSATTEL, J. P. & KIM, T. W. 2005. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 58, 909-19.
- SMALL, S. A. & PETSKO, G. A. 2015. Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci*, 16, 126-32.
- SMALL, S. A., SIMOES-SPASSOV, S., MAYEUX, R. & PETSKO, G. A. 2017. Endosomal Traffic Jams Represent a Pathogenic Hub and Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci*, 40, 592-602.
- SONNICHSEN, B., DE RENZIS, S., NIELSEN, E., RIETDORF, J. & ZERIAL, M. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, 149, 901-14.
- SORKIN, A. & VON ZASTROW, M. 2002. Signal transduction and endocytosis: close encounters of many kinds. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 600-14.
- SOUSA, R. & LAFER, E. M. 2015. The role of molecular chaperones in clathrin mediated vesicular trafficking. *Front Mol Biosci*, 2, 26.
- SPIRO, D. J., BOLL, W., KIRCHHAUSEN, T. & WESSLING-RESNICK, M. 1996. Wortmannin alters the transferrin receptor endocytic pathway in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*, 7, 355-67.
- ST GEORGE-HYSLOP, P. H., TANZI, R. E., POLINSKY, R. J., HAINES, J. L., NEE, L., WATKINS, P. C., MYERS, R. H., FELDMAN, R. G., POLLEN, D., DRACHMAN, D. & ET AL. 1987. The genetic defect causing familial Alzheimer's disease maps on chromosome 21. *Science*, 235, 885-90.
- STACK, J. H., HERMAN, P. K., SCHU, P. V. & EMR, S. D. 1993. A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *Embo j*, 12, 2195-204.
- STEIN, M. P., CAO, C., TESSEMA, M., FENG, Y., ROMERO, E., WELFORD, A. & WANDINGER-NESS, A. 2005. Interaction and functional analyses of human VPS34/p150 phosphatidylinositol 3-kinase complex with Rab7. *Methods Enzymol*, 403, 628-49.

- STEIN, M. P., FENG, Y., COOPER, K. L., WELFORD, A. M. & WANDINGER-NESS, A. 2003. Human VPS34 and p150 are Rab7 interacting partners. *Traffic*, 4, 754-71.
- STENMARK, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 513-25.
- STENMARK, H., AASLAND, R., TOH, B. H. & D'ARRIGO, A. 1996. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem*, 271, 24048-54.
- STENMARK, H. & GILLOOLY, D. J. 2001. Intracellular trafficking and turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Semin Cell Dev Biol*, 12, 193-9.
- STENMARK, H., PARTON, R. G., STEELE-MORTIMER, O., LUTCKE, A., GRUENBERG, J. & ZERIAL, M. 1994. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *Embo j*, 13, 1287-96.
- STENMARK, H., VITALE, G., ULLRICH, O. & ZERIAL, M. 1995. Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, 83, 423-32.
- STRITTMATTER, W. J., SAUNDERS, A. M., SCHMECHEL, D., PERICAK-VANCE, M., ENGHILD, J., SALVESEN, G. S. & 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, 1977-81.
- STURGEON, X. & GARDINER, K. J. 2011. Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. *Mamm Genome*, 22, 261-71.
- TACHEVA-GRIGOROVA, S. K., SANTOS, A. J., BOUCROT, E. & KIRCHHAUSEN, T. 2013. Clathrin-mediated endocytosis persists during unperturbed mitosis. *Cell Rep*, 4, 659-68.
- TAGUCHI, T. 2013. Emerging roles of recycling endosomes. *J Biochem*, 153, 505-10.
- TAKAHASHI, R. H., ALMEIDA, C. G., KEARNEY, P. F., YU, F., LIN, M. T., MILNER, T. A. & GOURAS, G. K. 2004. Oligomerization of Alzheimer's beta-amyloid within processes and synapses of cultured neurons and brain. *J Neurosci*, 24, 3592-9.
- TANZI, R. E., GUSELLA, J. F., WATKINS, P. C., BRUNS, G. A., ST GEORGE-HYSLOP, P., VAN KEUREN, M. L., PATTERSON, D., PAGAN, S., KURNIT, D. M. & NEVE, R. L. 1987. Amyloid beta protein gene: cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus. *Science*, 235, 880-4.
- TAUNTON, J., ROWNING, B. A., COUGHLIN, M. L., WU, M., MOON, R. T., MITCHISON, T. J. & LARABELL, C. A. 2000. Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol*, 148, 519-30.
- TELLER, J. K., RUSSO, C., DEBUSK, L. M., ANGELINI, G., ZACCHEO, D., DAGNABRICARELLI, F., SCARTEZZINI, P., BERTOLINI, S., MANN, D. M., TABATON, M. & GAMBETTI, P. 1996. Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome. *Nat Med*, 2, 93-5.
- TEMKIN, P., LAUFFER, B., JAGER, S., CIMERMANCIC, P., KROGAN, N. J. & VON ZASTROW, M. 2011. SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol*, 13, 715-21.
- THAL, D. R., RUB, U., ORANTES, M. & BRAAK, H. 2002. Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD. *Neurology*, 58, 1791-800.
- THINAKARAN, G. & KOO, E. H. 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, 283, 29615-9.
- THOMAS, S., RITTER, B., VERBICH, D., SANSON, C., BOURBONNIERE, L., MCKINNEY, R. A. & MCPHERSON, P. S. 2009. Intersectin regulates dendritic spine development and somatodendritic endocytosis but not synaptic vesicle recycling in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 284, 12410-9.
- TJELLE, T. E., BRECH, A., JUVET, L. K., GRIFFITHS, G. & BERG, T. 1996. Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J Cell Sci*, 109 (Pt 12), 2905-14.
- TLILI, A., HOISCHEN, A., RIPOLL, C., BENABOU, E., BADEL, A., RONAN, A., TOURAINE, R., GRATTAU, Y., STORA, S., VAN BON, B., DE VRIES, B., MENTEN, B., BOCKAERT, N., GECZ, J., ANTONARAKIS, S. E., CAMPION, D., POTIER, M. C., BLEHAUT, H., DELABAR, J. M. & JANEL, N. 2012. BDNF and DYRK1A are variable and inversely

- correlated in lymphoblastoid cell lines from Down syndrome patients. *Mol Neurobiol*, 46, 297-303.
- TOH, W. H., CHIA, P. Z. C., HOSSAIN, M. I. & GLEESON, P. A. 2018. GGA1 regulates signal-dependent sorting of BACE1 to recycling endosomes, which moderates Abeta production. *Mol Biol Cell*, 29, 191-208.
- TONG, X. K., HUSSAIN, N. K., DE HEUVEL, E., KURAKIN, A., ABI-JAOUDE, E., QUINN, C. C., OLSON, M. F., MARAIS, R., BARANES, D., KAY, B. K. & MCPHERSON, P. S. 2000. The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *Embo j*, 19, 1263-71.
- TOOZE, J. & HOLLINSHEAD, M. 1991. Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *J Cell Biol*, 115, 635-53.
- TORRES, M., JIMENEZ, S., SANCHEZ-VARO, R., NAVARRO, V., TRUJILLO-ESTRADA, L., SANCHEZ-MEJIAS, E., CARMONA, I., DAVILA, J. C., VIZUETE, M., GUTIERREZ, A. & VITORICA, J. 2012. Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener*, 7, 59.
- TREUSCH, S., HAMAMICHI, S., GOODMAN, J. L., MATLACK, K. E., CHUNG, C. Y., BARU, V., SHULMAN, J. M., PARRADO, A., BEVIS, B. J., VALASTYAN, J. S., HAN, H., LINDHAGEN-PERSSON, M., REIMAN, E. M., EVANS, D. A., BENNETT, D. A., OLOFSSON, A., DEJAGER, P. L., TANZI, R. E., CALDWELL, K. A., CALDWELL, G. A. & LINDQUIST, S. 2011. Functional links between Abeta toxicity, endocytic trafficking, and Alzheimer's disease risk factors in yeast. *Science*, 334, 1241-5.
- UBELMANN, F., BURRINHA, T., SALAVESSA, L., GOMES, R., FERREIRA, C., MORENO, N. & GUIMAS ALMEIDA, C. 2017. Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. *EMBO Rep*, 18, 102-122.
- ULLRICH, O., STENMARK, H., ALEXANDROV, K., HUBER, L. A., KAIBUCHI, K., SASAKI, T., TAKAI, Y. & ZERIAL, M. 1993. Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem*, 268, 18143-50.
- UNGEWICKELL, E. 1985. The 70-kd mammalian heat shock proteins are structurally and functionally related to the uncoating protein that releases clathrin triskelia from coated vesicles. *Embo j*, 4, 3385-91.
- UNGEWICKELL, E. & BRANTON, D. 1981. Assembly units of clathrin coats. *Nature*, 289, 420-2.
- UNGEWICKELL, E., UNGEWICKELL, H., HOLSTEIN, S. E., LINDNER, R., PRASAD, K., BAROUCH, W., MARTIN, B., GREENE, L. E. & EISENBERG, E. 1995. Role of auxilin in uncoating clathrin-coated vesicles. *Nature*, 378, 632-5.
- VAN DER SLUIJS, P., HULL, M., WEBSTER, P., MALE, P., GOUD, B. & MELLMAN, I. 1992. The small GTP-binding protein rab4 controls an early sorting event on the endocytic pathway. *Cell*, 70, 729-40.
- VANHOUWAERT, R., KUENEN, S., MASIUS, R., BADEMOSI, A., MANETSBERGER, J., SCHOOVAERTS, N., BOUNTI, L., GONTCHARENKO, S., SWERTS, J., VILAIN, S., PICILLO, M., BARONE, P., MUNSHI, S. T., DE VRIJ, F. M., KUSHNER, S. A., GOUNKO, N. V., MANDEMAKERS, W., BONIFATI, V., MEUNIER, F. A., SOUKUP, S. F. & VERSTREKEN, P. 2017. The SAC1 domain in synaptojanin is required for autophagosome maturation at presynaptic terminals. *Embo j*, 36, 1392-1411.
- VARDARAJAN, B. N., BRUESEGEM, S. Y., HARBOUR, M. E., INZELBERG, R., FRIEDLAND, R., ST GEORGE-HYSLOP, P., SEAMAN, M. N. & FARRER, L. A. 2012. Identification of Alzheimer disease-associated variants in genes that regulate retromer function. *Neurobiol Aging*, 33, 2231.e15-2231.e30.
- VASSAR, R., BENNETT, B. D., BABU-KHAN, S., KAHN, S., MENDIAZ, E. A., DENIS, P., TEPLow, D. B., ROSS, S., AMARANTE, P., LOELOFF, R., LUO, Y., FISHER, S., FULLER, J., EDENSON, S., LILE, J., JAROSINSKI, M. A., BIERE, A. L., CURRAN, E., BURGESS, T., LOUIS, J. C., COLLINS, F., TREANOR, J., ROGERS, G. & CITRON, M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735-41.

- VERGHESE, P. B., CASTELLANO, J. M. & HOLTZMAN, D. M. 2011. Apolipoprotein E in Alzheimer's disease and other neurological disorders. *Lancet Neurol*, 10, 241-52.
- VETRIVEL, K. S., MECKLER, X., CHEN, Y., NGUYEN, P. D., SEIDAH, N. G., VASSAR, R., WONG, P. C., FUKATA, M., KOUNNAS, M. Z. & THINAKARAN, G. 2009. Alzheimer disease Abeta production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. *J Biol Chem*, 284, 3793-803.
- VIEIRA, S. I., REBELO, S., ESSELMANN, H., WILTFANG, J., LAH, J., LANE, R., SMALL, S. A., GANDY, S., DA CRUZ, E. S. E. F. & DA CRUZ, E. S. O. A. 2010. Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated. *Mol Neurodegener*, 5, 40.
- VILLASENOR, R., NONAKA, H., DEL CONTE-ZERIAL, P., KALAIIDZIDIS, Y. & ZERIAL, M. 2015. Regulation of EGFR signal transduction by analogue-to-digital conversion in endosomes. *Elife*, 4.
- VIOLA, K. L. & KLEIN, W. L. 2015. Amyloid beta oligomers in Alzheimer's disease pathogenesis, treatment, and diagnosis. *Acta Neuropathol*, 129, 183-206.
- VISSER, F. E., ALDENKAMP, A. P., VAN HUFFELEN, A. C., KUILMAN, M., OVERWEG, J. & VAN WIJK, J. 1997. Prospective study of the prevalence of Alzheimer-type dementia in institutionalized individuals with Down syndrome. *Am J Ment Retard*, 101, 400-12.
- VITALE, G., RYBIN, V., CHRISTOFORIDIS, S., THORNQVIST, P., MCCAFFREY, M., STENMARK, H. & ZERIAL, M. 1998. Distinct Rab-binding domains mediate the interaction of Rabaptin-5 with GTP-bound Rab4 and Rab5. *Embo j*, 17, 1941-51.
- VOGEL, G. F., EBNER, H. L., DE ARAUJO, M. E., SCHMIEDINGER, T., EITER, O., PIRCHER, H., GUTLEBEN, K., WITTING, B., TEIS, D., HUBER, L. A. & HESS, M. W. 2015. Ultrastructural Morphometry Points to a New Role for LAMTOR2 in Regulating the Endo/Lysosomal System. *Traffic*, 16, 617-34.
- VORONOV, S. V., FRERE, S. G., GIOVEDI, S., POLLINA, E. A., BOREL, C., ZHANG, H., SCHMIDT, C., AKESON, E. C., WENK, M. R., CIMASONI, L., ARANCIO, O., DAVISSON, M. T., ANTONARAKIS, S. E., GARDINER, K., DE CAMILLI, P. & DI PAOLO, G. 2008. Synaptojanin 1-linked phosphoinositide dyshomeostasis and cognitive deficits in mouse models of Down's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9415-20.
- WANG, J., FEDOSEIENKO, A., CHEN, B., BURSTEIN, E., JIA, D. & BILLADEAU, D. D. 2018. Endosomal receptor trafficking: Retromer and beyond. *Traffic*, 19, 578-590.
- WANG, X., HUANG, T., ZHAO, Y., ZHENG, Q., THOMPSON, R. C., BU, G., ZHANG, Y. W., HONG, W. & XU, H. 2014. Sorting nexin 27 regulates Abeta production through modulating gamma-secretase activity. *Cell Rep*, 9, 1023-33.
- WANG, X., ZHAO, Y., ZHANG, X., BADIE, H., ZHOU, Y., MU, Y., LOO, L. S., CAI, L., THOMPSON, R. C., YANG, B., CHEN, Y., JOHNSON, P. F., WU, C., BU, G., MOBLEY, W. C., ZHANG, D., GAGE, F. H., RANSCHT, B., ZHANG, Y. W., LIPTON, S. A., HONG, W. & XU, H. 2013. Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. *Nat Med*, 19, 473-80.
- WANG, X., ZHOU, X., LI, G., ZHANG, Y., WU, Y. & SONG, W. 2017. Modifications and Trafficking of APP in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease. *Front Mol Neurosci*, 10, 294.
- WAUGH, M. G. 2015. PIPs in neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1851, 1066-82.
- WEGNER, C. S., MALEROD, L., PEDERSEN, N. M., PROGIDA, C., BAKKE, O., STENMARK, H. & BRECH, A. 2010. Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5. *Histochem Cell Biol*, 133, 41-55.
- WEICK, J. P., HELD, D. L., BONADURER, G. F., 3RD, DOERS, M. E., LIU, Y., MAGUIRE, C., CLARK, A., KNACKERT, J. A., MOLINAROLO, K., MUSSER, M., YAO, L., YIN, Y., LU, J., ZHANG, X., ZHANG, S. C. & BHATTACHARYYA, A. 2013. Deficits in human trisomy 21 iPSCs and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9962-7.
- WEST, H. L., REBECK, G. W. & HYMAN, B. T. 1994. Frequency of the apolipoprotein E epsilon 2 allele is diminished in sporadic Alzheimer disease. *Neurosci Lett*, 175, 46-8.

- WHITE, I. J., BAILEY, L. M., AGHAKHANI, M. R., MOSS, S. E. & FUTTER, C. E. 2006. EGF stimulates annexin 1-dependent inward vesiculation in a multivesicular endosome subpopulation. *Embo j*, 25, 1-12.
- WHITLEY, P., REAVES, B. J., HASHIMOTO, M., RILEY, A. M., POTTER, B. V. & HOLMAN, G. D. 2003. Identification of mammalian Vps24p as an effector of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate-dependent endosome compartmentalization. *J Biol Chem*, 278, 38786-95.
- WILMOT, B., MCWEENEY, S. K., NIXON, R. R., MONTINE, T. J., LAUT, J., HARRINGTON, C. A., KAYE, J. A. & KRAMER, P. L. 2008. Translational gene mapping of cognitive decline. *Neurobiol Aging*, 29, 524-41.
- WILSON, J. M., DE HOOP, M., ZORZI, N., TOH, B. H., DOTTI, C. G. & PARTON, R. G. 2000. EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell*, 11, 2657-71.
- WISEMAN, F. K., AL-JANABI, T., HARDY, J., KARMILOFF-SMITH, A., NIZETIC, D., TYBULEWICZ, V. L., FISHER, E. M. & STRYDOM, A. 2015. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci*, 16, 564-74.
- WISEMAN, F. K., PULFORD, L. J., BARKUS, C., LIAO, F., PORTELIUS, E., WEBB, R., CHAVEZ-GUTIERREZ, L., CLEVERLEY, K., NOY, S., SHEPPARD, O., COLLINS, T., POWELL, C., SARELL, C. J., RICKMAN, M., CHOONG, X., TOSH, J. L., SIGANPORIA, C., WHITTAKER, H. T., STEWART, F., SZARUGA, M., MURPHY, M. P., BLENNOW, K., DE STROOPER, B., ZETTERBERG, H., BANNERMAN, D., HOLTZMAN, D. M., TYBULEWICZ, V. L. J. & FISHER, E. M. C. 2018. Trisomy of human chromosome 21 enhances amyloid-beta deposition independently of an extra copy of APP. *Brain*.
- WISNIEWSKI, K. E., DALTON, A. J., MCLACHLAN, C., WEN, G. Y. & WISNIEWSKI, H. M. 1985. Alzheimer's disease in Down's syndrome: clinicopathologic studies. *Neurology*, 35, 957-61.
- WOLLERT, T. & HURLEY, J. H. 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464, 864-9.
- WOLLERT, T., WUNDER, C., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & HURLEY, J. H. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458, 172-7.
- XIAO, Q., GIL, S. C., YAN, P., WANG, Y., HAN, S., GONZALES, E., PEREZ, R., CIRRITO, J. R. & LEE, J. M. 2012. Role of phosphatidylinositol clathrin assembly lymphoid-myeloid leukemia (PICALM) in intracellular amyloid precursor protein (APP) processing and amyloid plaque pathogenesis. *J Biol Chem*, 287, 21279-89.
- XU, W., WEISSMILLER, A. M., WHITE, J. A., 2ND, FANG, F., WANG, X., WU, Y., PEARN, M. L., ZHAO, X., SAWA, M., CHEN, S., GUNAWARDENA, S., DING, J., MOBLEY, W. C. & WU, C. 2016. Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 126, 1815-33.
- YAMADA, H., PADILLA-PARRA, S., PARK, S. J., ITOH, T., CHAINEAU, M., MONALDI, I., CREMONA, O., BENFENATI, F., DE CAMILLI, P., COPPEY-MOISAN, M., TRAMIER, M., GALLI, T. & TAKEI, K. 2009. Dynamic interaction of amphiphysin with N-WASP regulates actin assembly. *J Biol Chem*, 284, 34244-56.
- YAMAZAKI, T., KOO, E. H. & SELKOE, D. J. 1996. Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci*, 109 (Pt 5), 999-1008.
- YIN, R. H., YU, J. T. & TAN, L. 2015. The Role of SORL1 in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol*, 51, 909-18.
- YOON, P. W., FREEMAN, S. B., SHERMAN, S. L., TAFT, L. F., GU, Y., PETTAY, D., FLANDERS, W. D., KHOURY, M. J. & HASSOLD, T. J. 1996. Advanced maternal age and the risk of Down syndrome characterized by the meiotic stage of chromosomal error: a population-based study. *Am J Hum Genet*, 58, 628-33.
- YU, T., LI, Z., JIA, Z., CLAPCOTE, S. J., LIU, C., LI, S., ASRAR, S., PAO, A., CHEN, R., FAN, N., CARATTINI-RIVERA, S., BECHARD, A. R., SPRING, S., HENKELMAN, R. M., STOICA, G., MATSUI, S., NOWAK, N. J., RODER, J. C., CHEN, C., BRADLEY, A. & YU, Y. E. 2010. A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Hum Mol Genet*, 19, 2780-91.

- YU, Y., CHU, P. Y., BOWSER, D. N., KEATING, D. J., DUBACH, D., HARPER, I., TKALCEVIC, J., FINKELSTEIN, D. I. & PRITCHARD, M. A. 2008. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog *Itsn1* exhibit vesicle-trafficking abnormalities. *Hum Mol Genet*, 17, 3281-90.
- ZEIGERER, A., GILLERON, J., BOGORAD, R. L., MARSICO, G., NONAKA, H., SEIFERT, S., EPSTEIN-BARASH, H., KUCHIMANCHI, S., PENG, C. G., RUDA, V. M., DEL CONTE-ZERIAL, P., HENGSTLER, J. G., KALAIIDZIDIS, Y., KOTELIANSKY, V. & ZERIAL, M. 2012. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, 485, 465-70.
- ZHANG, Z., NADEAU, P., SONG, W., DONOVIEL, D., YUAN, M., BERNSTEIN, A. & YANKNER, B. A. 2000. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol*, 2, 463-5.
- ZHU, L., ZHONG, M., ELDER, G. A., SANO, M., HOLTZMAN, D. M., GANDY, S., CARDOZO, C., HAROUTUNIAN, V., ROBAKIS, N. K. & CAI, D. 2015. Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 11965-70.
- ZHU, L., ZHONG, M., ZHAO, J., RHEE, H., CAESAR, I., KNIGHT, E. M., VOLTICELLI-DALEY, L., BUSTOS, V., NETZER, W., LIU, L., LUCAST, L., EHRLICH, M. E., ROBAKIS, N. K., GANDY, S. E. & CAI, D. 2013. Reduction of synaptotagmin 1 accelerates Abeta clearance and attenuates cognitive deterioration in an Alzheimer mouse model. *J Biol Chem*, 288, 32050-63.
- ZONCU, R., PERERA, R. M., BALKIN, D. M., PIRRUCCELLO, M., TOOMRE, D. & DE CAMILLI, P. 2009. A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell*, 136, 1110-21.

ANNEXES

ANNEXE 1

Article soumis au journal Acta Neuropathologica en janvier 2017, revu puis rejeté.

Early endosome clustering in Down syndrome revealed by ultrastructural and super-resolution microscopies

ANNEXE 2

Revue soumise à Elsevier pour l'ouvrage PBR : Preclinical Research in Down Syndrome :
From Bench to Bedside Volume 250.

The endo-lysosomal pathway in Down syndrome

Annexe 1

Article soumis au journal Acta Neuropathologica en janvier 2017, revu puis rejeté.

Early endosome clustering in Down syndrome revealed by ultrastructural and super-resolution microscopies

Early endosome clustering in Down syndrome revealed by ultrastructural and super-resolution microscopies

Alexandra Botté¹, Jeanne Lainé^{1,2}, Agathe Franck¹, Gaëlle Fontaine¹, Luce Dauphinot¹, Isabelle Rivals³, Pollyanna Goh⁴, Orestis Faklaris⁵, Jack-Christophe Cossec¹, Fabian Corlier¹, Anne-Sophie Rebillat⁶, Dean Nizetic^{4,7} and Marie-Claude Potier^{1*}

¹Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM), CNRS UMR7225, INSERM U1127, Université Pierre et Marie Curie (UPMC, Paris 6), Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

²Université Pierre Marie Curie Université (UPMC, Paris 6), Département de Physiologie, Hôpital de la Pitié-Salpêtrière, Paris, France

³Equipe de Statistique Appliquée, ESPCI Paris, PSL Research University, UMRS 1158, Paris, France

⁴The Blizzard Institute, Barts and the London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary, University of London, London, United-Kingdom

⁵ImagoSeine Imaging Core Facility, Institut Jacques Monod, CNRS UMR7592, Université Paris-Diderot, Sorbonne Paris Cité, Paris, France

⁶Institut Jérôme Lejeune, Paris, France

⁷Lee Kong Chian School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore

*Correspondance : Dr. Marie-Claude Potier

ICM, CNRS UMR7225, INSERM U1127, UPMC

Hôpital de la Pitié-Salpêtrière

47 bd de l'Hôpital

75013 Paris

+33157274519 / +33681998178

marie-claude.potier@upmc.fr

Acknowledgements

This study was supported by LECMA Vaincre Alzheimer, the Fondation Jérôme Lejeune and the French Ministry of Health (PHRC-0054-N 2013). The research leading to these results has received funding from the program “Investissements d'avenir” (ANR-10-IAIHU-06). DN is supported by The Wellcome Trust “LonDownS Consortium” Strategic Funding Award (098330/Z/12/Z), Singapore Ministry of Education Academic Research Fund Tier 2 (2015-T2-1-023) and Singapore National Medical Research Council - Clinician Scientist Individual Research Grant (NMRC/CS-IRG/1438/2015). We acknowledge France-BioImaging infrastructure supported by the French National Research Agency (ANR-10-INBS-04). Analysis by confocal microscopy was performed at the cellular imaging core facility of Pitié-Salpêtrière (Plateforme d'Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière). We thank the team of Boris Keren for lymphoblastoid cell lines karyotyping and Ihsen Youssef for mice perfusion. This work was carried out on the animal core facility and the histomics core facility of the ICM, we thank all technical staff involved for their help with mice studies and histology. We wish to thank Prof. Duyckaerts for reading the manuscript.

Abstract

Early morphological alterations of subcellular organelles from the endo-lysosomal pathway were widely observed in Alzheimer's disease (AD) and Down syndrome (DS). An abnormal increase in the size of early endosomes was found in peripheral cells and in neurons from *postmortem* brains of individuals with DS and AD and in neurons of mouse models of DS and AD. These changes were correlated with increased APP processing and overproduction of synaptojanin 1. Despite early endosome size ranging in the resolution limit of light microscopy, their morphology has not been explored at a high resolution. Here, we relied on super-resolution microscopy and ultrastructural imaging to further characterize the endosomal compartment in the DS condition. We immunolabelled early endosomes of lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from individuals with DS as well as basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) from Ts65Dn brains, a mouse model of DS. Electron microscopy (EM) revealed clusters of adjacent normal-sized early endosomes rather than endosomes of large size. Early endosomes of neurons derived from isogenic euploid and trisomy 21 induced pluripotent stem cells clones from an individual with a mosaic trisomy 21 were then immunolabelled. When observed by confocal microscopy, the volume of early endosomes in trisomy 21 neurons was increased as compared to isogenic euploid neurons. However EM and super-resolution structured illumination microscopy (SIM) revealed that enlarged endosomes actually corresponded to clusters of endosomes of unchanged volume. High resolution microscopy revealed that previously described enlarged endosomes in DS corresponded to clusters of normal-sized endosomes. This newly described phenotype suggests mechanisms to be discovered that could rely on defects of trafficking, maturation or fusion of endosomes. Early endosome clustering could have major consequences on protein trafficking including APP and more generally on cellular functioning.

Keywords

Down syndrome, Alzheimer's disease, early endosomes, endocytosis, electron microscopy, super-resolution microscopy

Introduction

Early morphological alterations of subcellular organelles from the endo-lysosomal pathway have been extensively described in Alzheimer's disease (AD) and Down syndrome (DS), notably an abnormal increase in the size of early endosomes in pyramidal neurons of the cortex (Cataldo et al., 1997). Such alteration of the morphology of endosomes is still considered as the earliest neuropathological hallmark of AD since it occurs in the neocortex of patients with sporadic AD before amyloid peptides deposition, in Familial early onset AD (FAD) with mutations in the gene encoding the Amyloid Precursor Protein (APP), and in DS individuals carrying a trisomy for chromosome 21 (HSA21) (Cataldo et al., 2001, Cataldo et al., 2000). APP gene maps to HSA21 and is triplicated in DS resulting in an overexpression of APP which is believed to increase the occurrence of AD in this population (Beyreuther et al., 1993, Coppus et al., 2012). Indeed individuals with DS start to develop typical symptoms of AD type dementia in their fifth decade of life, such as behavioral changes and memory deficits, early cerebral amyloid deposition confirmed by positron emission tomography (PET) using Pittsburgh Compound B (PiB) and Florbetapir, and change of A β peptides levels in plasma and cerebrospinal fluid (Coppus et al., 2012, Head et al., 2016, Mann and Esiri, 1989, Portelius et al., 2014, Sabbagh et al., 2015, Wiseman et al., 2015). Neurons of individuals with DS harbor enlarged endosomes decades before the formation of amyloid deposits and the onset of AD clinical symptoms (Cataldo et al., 2000).

Endocytosis is an essential process by which cells internalize cargoes: mutations in proteins controlling early endosome function lead to severe neurodegenerative diseases (Neefjes and van der Kant, 2014). APP belongs to these endocytosed cargoes and more importantly amyloid peptides are produced through the endosomal pathway following internalization of APP and its cleaving enzymes (Koo and Squazzo, 1994, Thinakaran and Koo, 2008). Overexpression of the Rab GTPase Rab5, a major regulator of endosome biogenesis, increases intracellular amyloid β (A β) production (Grbovic et al., 2003).

We and others have found enlarged endosomes in peripheral blood mononuclear cells (PBMC), lymphoblastoid cell lines (LCLs) and primary fibroblasts from individuals with DS (Cataldo et al., 2008, Cossec et al., 2012, Jiang et al., 2010) and AD (Corlier et al., 2015). In addition, previous studies showed endosomal enlargement in the brain of mouse models of FAD with mutations in the APP gene (Choi et al., 2013) and in Ts65Dn mice (Cataldo et al., 2003), the best-characterized and most widely used mouse model of DS. This model carries a segmental duplication of chromosome 16 extending between genes *Mrp139* and *Znf295*, contains approximately 92 orthologues of HSA21 genes (Sturgeon and Gardiner, 2011) and recapitulates several fundamental features of DS, including cognitive deficits and alterations of brain morphology and functioning (Cataldo et al., 2003, Reeves et

al., 1995). All these data rely on measurements obtained by conventional light microscopy with a resolution that is fundamentally limited by the diffraction of light at 200 nm at best, *i.e.* in the diameter range of early endosomes (de Hoop et al., 1994).

In order to fully characterize the endosomal compartment in trisomy 21, we used Electron Microscopy (EM) and super-resolution Structured Illumination Microscopy (SIM) which operates beyond the diffraction-limited resolution (Shao et al., 2011). We were hence able to revisit early endosome morphological alterations in cellular models of DS (LCLs, fibroblasts), in the brain of Ts65Dn mice and in human neurons derived from isogenic induced pluripotent stem cells (iPSC) from an individual with mosaic trisomy 21.

In all biological materials from DS condition analyzed by conventional confocal microscopy we confirmed a significant increase in the mean size of early endosomes labelled with a monoclonal antibody against Early Endosome Antigen 1 (EEA1) as compared to biological material from the control condition. However, using either EM or SIM we showed for the first time that enlarged endosomes in the DS condition were actually clusters of normal-sized endosomes. Our results bring a new vista on early morphological alterations in DS and imply new mechanisms related to endosome clustering rather than endosomal enlargement.

Materials and methods

Cell culture

Lymphoblastoid cell lines (LCLs)

LCLs from individuals with DS without AD (7 individuals) and DS with AD (7 individuals) were provided by Institut Lejeune (Paris). LCLs were obtained by immortalization of lymphocyte B with Epstein-Barr virus according to Tlili *et al.* (2012) (Tlili *et al.*, 2012). LCLs were cultured in OptiMEM (Gibco, Life Technologies) supplemented with 10 % fetal bovine serum and 1 % penicillin/streptomycin.

All LCLs were karyotyped. They first underwent hypotonic shock with pre-heated potassium chloride at 5.6 g/L for 20 minutes at 37 °C, before two fixation steps in Carnoy (25 % acetic acid, 75 % methanol) of 20 minutes each. Fluorescence *in situ* hybridization (FISH) was then carried out using the centromeric probe of chromosome 21 (Cytocell) and trisomy 21 was searched on 50 cells per cell line.

Apolipoprotein E (APOE) genotype was determined for each individual by PCR-based Sanger sequencing. Genomic DNA was extracted from LCLs using Nucleospin Tissue kit from Macherey Nagel according to the manufacturer's instructions. Exon 4 from APOE gene containing the SNP corresponding to the $\epsilon 3/\epsilon 4$ alleles was amplified using PCR with the following primers: APOE sense, 5'-TAAGCTTGGCACGGCTGTCCAAGGA-3'; APOE antisense, 5'-ACAGAATTTCGCCCCGGCCTGGTACAC-3'. For each sample, the reaction mixture (50 μ l) contained 200 ng of genomic DNA, 10 μ l PCR Flexi buffer (5x), 3 μ l MgCl₂ (25 mM), 1 μ l dNTPs (10 mM), 1 μ l of each forward and reverse primers (10 μ M), and 0.25 μ l GO Taq DNA polymerase (Promega). The cycling program was carried out after a preheating step at 95 °C for 2 minutes and 35 cycles of denaturation at 95 °C for 1 minute, annealing at 68 °C for 1 minute and extension at 72 °C for 1 minute. The amplified fragments were then purified and sequenced with the same primers.

Diagnosis of AD was based on clinical assessment (including history, physical examination, specific neuropsychological assessment and brain MRI) and according to the ICD 10/DSM V/NINCDS-ADRDA criteria (Sheehan *et al.*, 2015). Clinicians had experience in assessing this population for cognitive decline.

Informed consent was obtained from all individuals included in the study and additional informed consent was obtained from all individual participants for whom identifying information is included in this article. All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments.

Fibroblasts

Cells were purchased from Coriell Cell Repositories and were cultured as in Cossec et al, 2012 (Cossec et al., 2012). ID numbers of euploid cells were AG07095 and GM00408. Those of DS cells were AG04823 and AG06922.

Human isogenic induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs)-derived neurons

Isogenic human DS iPS cell lines were generated from consented surplus diagnostic samples of human skin fibroblasts using Sendai virus reprogramming and fully characterized and cultured as described previously in Murray *et al.* (2015) (Murray et al., 2015). Neuronal differentiation was performed by first deriving neural stem cells (NSCs) using Life Technologies Neural Induction medium as per manufacturer's protocol or the dual SMAD inhibition method as described in (Murray et al., 2015). For terminal neuronal differentiation, NSCs at passages 7-9 were seeded onto poly-L-ornithine and laminin (Sigma Aldrich) coated glass coverslips (thickness of 0.17 ± 0.005 mm) for optical microscopies or plastic coverslips for electron microscopy at a density of 20,000-50,000 cells/cm². The next day, the medium was switched to 3N medium supplemented with 10 ng/ml of BDNF and GDNF (Peprotech), 1 mM cAMP and 200 nM ascorbic acid (Sigma Aldrich). Fresh medium was changed twice a week and cells were fixed for analysis at days 60-65 post terminal differentiation. For confocal microscopy, we analyzed cells from the euploid clone C3 and the DS clone C5. For SIM, we analyzed cells from the euploid clone C9 and the DS clone C5. For EM, we analyzed cells from the euploid clones C3 and C7 and DS clones C5 and C6.

Animals

F1 Ts65Dn mice were obtained from the Jackson Laboratory and maintained on a B6C3HF1 background by breeding Ts65Dn/B6EiC3 females (SN005252) with B6EiC3 males (SN003647). Only male Ts65Dn mice were used in the study, as differences in basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) size and number were observed between Ts65Dn males and females (Kelley et al., 2014). We used 4-month-old mice: 4 wild-type (WT) mice and 5 Ts65Dn mice.

All applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of French and European regulations (European Communities Council Directive of 24 November 1986). The supervisor of *in vivo* studies (M-C. Potier) received official authorization from the French Ministry of Agriculture to carry out research and experiments on animals (authorization number A-75-2138).

Immunofluorescence

Immunocytochemistry on LCLs

LCLs in suspension underwent centrifugation at 100 g for 5 minutes and were re-suspended in phosphate-buffered saline (PBS). LCLs were fixed in paraformaldehyde 2 % for 10 minutes, blocked in normal goat serum 2 % for 30 minutes and permeabilized in Triton X-100 0.2 % in PBS for 10 minutes. LCLs were incubated in primary rabbit anti-EEA1 antibody (monoclonal, C45B10, Cell Signaling, 1/100) diluted in the blocking solution for 2 hours. LCLs were rinsed and incubated in anti-rabbit AlexaFluor-488 (1/1000, Invitrogen) secondary antibody for 1 hour and were counterstained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, 1 µg/mL, Vector Laboratories). They were finally re-suspended in PBS, added and mixed to Fluoromount-G (Southern Biotech) on glass slides. Z-stack images (1024 x 1024 pixels, representing voxels of 0.073 x 0.073 x 0.270 µm) were acquired with an Olympus Fluoview Fv1000 confocal microscope with a 63x/NA=1.40 oil immersion objective at the Plate-Forme d'Imagerie Cellulaire Pitié-Salpêtrière facility (PICPS).

Immunocytochemistry on iPSCs-derived neurons

Neurons were fixed in paraformaldehyde 4 % for 20 minutes. After paraformaldehyde quenching (NH₄Cl 50 mM), permeabilization (Triton X-100 0.2 % in PBS) and blocking (bovine serum albumin 3 % in PBS) steps, cells were incubated 1 hour in rabbit anti-EEA1 primary antibody (C45B10, Cell Signaling, 1/500), and mouse anti-MAP2 antibody (monoclonal, MAB3418, Millipore, 1/500) or mouse anti-β3-tubuline antibody (monoclonal, Sigma, T8660, 1/500) as neuronal markers. Cells were rinsed and incubated with anti-rabbit AlexaFluor-488 and anti-mouse AlexaFluor-568 secondary antibodies for 1 hour (1/1000, Invitrogen), counterstained with DAPI (1 µg/mL, Vector Laboratories), rinsed and mounted in Fluoromount-G for confocal microscopy or Vectashield (Vector Laboratories) for SIM. For confocal microscopy, z-stacks images (1024 x 1024 pixels, representing voxels of 0.0581 x 0.0581 x 0.244 µm) were taken using a Leica TCS SP2 AOBS confocal microscope with a 63x/NA=1.40 oil immersion objective and x4 zoom at PICPS facility.

Immunohistochemistry

4-month-old WT (n=4) and Ts65Dn (n=5) mice were anaesthetized by intraperitoneal injection of pentobarbital (60 mg/kg) and transaortically perfused with paraformaldehyde 4 % / glutaraldehyde 0.05 % / phosphate buffer 0.1 M. Brains were dissected and post-fixed in paraformaldehyde 4 % / glutaraldehyde 0.05 % / phosphate buffer 0.1 M overnight at 4 °C and then transferred in PBS at 4 °C until sectioning. 40 µm-thick coronal sections were obtained using a vibratome (Microm) and stored in PBS / sodium azide 0.4 % until staining.

Free floating brain sections were washed three times in PBS and pre-incubated in blocking and permeabilization solution (normal donkey serum 5 % / Triton X-100 0.2 % in PBS) for 1 hour. Brain sections incubated overnight in primary antibody solution: goat anti-choline-acetyltransferase (ChAT) antibody (polyclonal, AB144P, Millipore, 1/300), mouse anti-NeuN antibody (monoclonal, MAB377, Millipore, 1/500) and rabbit anti-EEA1 antibody (C45B10, Cell Signaling, 1/400). Primary anti-ChAT antibody was a kind gift from Dr. Sylvie Berrard (Hôpital universitaire Robert-Debré, Paris, France). Tissues were rinsed in normal donkey serum 5 % / Triton X-100 0.2 % / PBS and then incubated with secondary fluorescent polyclonal antibodies: AlexaFluor-488 donkey anti-rabbit, AlexaFluor-555 donkey anti-goat and AlexaFluor-647 donkey anti-mouse (Molecular Probes, 1/500). Brain sections were rinsed in phosphate buffer 0.1 M, stained with DAPI (10 µg/mL) and mounted on Superfrost Plus slides (Thermo Scientific) in Fluoromount G. Samples were imaged by confocal microscopy, using a Leica TCS SP2 AOBS and Leica TCS SP8 with a 63x, NA=1.40 oil immersion objective and x3 zoom (single z-scans, 1024 x 1024 pixels, representing pixels of 0.077 x 0.077 µm) at PICPS. Images were taken at the cell equatorial section, where the nuclear surface is largest. Three brain sections from each mouse were used and 24 neurons were analyzed per neuronal type and per mouse (8 from each section).

Electron microscopy

Pre-embedding immunocytochemistry

Early endosomes of LCLs, fibroblasts and neurons derived from iPSCs were labelled by anti-EEA1 antibody (C45B10, Cell Signaling) with pre-embedding immunoperoxidase cytochemistry and observed as described previously. (Marquer et al., 2014)

Pre-embedding immunohistochemistry of basal forebrain cholinergic neurons

4-month-old WT and Ts65Dn mice were anaesthetized (pentobarbital 60 mg/kg) and transcardially perfused with paraformaldehyde 4 % / glutaraldehyde 0.1 % / phosphate buffer 0.1 M. Dissected brains were further post-fixed in paraformaldehyde 4 % / sucrose 15 % in PBS for 2 hours at 4 °C. 70 µm-thick coronal sections were obtained using a vibratome (Microm). After glycine aldehyde 0.1 M quenching and H₂O₂ 0.3 % blocking of endogenous peroxidase, sections were treated with bovine serum albumin 5 % / normal donkey serum 5 % in PBS, and further incubated in anti-EEA1 (C45B10, Cell Signaling, 1/500) and anti-ChAT (AB144P, Millipore, 1/200) in PBS overnight at room temperature. For ChAT labelling, incubation in donkey anti-goat conjugated to ultra-small gold (Aurion, Netherlands, 1/50) was followed by extensive washings, 10 minutes post-fixation in glutaraldehyde 2 % and finally a silver enhancement reaction (HQ Silver, NanoProbes). For EEA1 labelling a biotinylated anti-rabbit

IgG (Vector, CA, USA) was applied as secondary antibody, followed by ABC peroxidase complex amplification (Vectastain Elite, Vector, CA, USA) and revelation was performed with diaminobenzidin (DAB) 0.05 % as the chromogen. After OsO₄ 1 % post-fixation, dehydration in graded acetone including a uranyl 1 % staining step in acetone 70 % preceded embedding in Epon resin. Ultrathin sections were lightly stained with lead citrate, observed using a Philips CM120 electron microscope (Philips, Eindhoven, The Netherlands) operated at 80 kV, images were recorded with a Morada digital camera (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH, Münster, Germany), and measures were taken with the associated iTEM software.

3D Structured Illumination Microscopy (SIM)

Super-resolution light microscopy was performed on a Zeiss ELYRA SIM microscope, equipped with a Plan-Apochromat 63×/1.40 NA oil-immersion objective (Carl Zeiss). The illumination patterns of the 405, 488 and 561 nm lasers were projected into the sample. The emitted fluorescence light was detected with an EMCCD camera (iXon 885, Andor Technology). Five phase translations and three rotations of the illumination pattern were recorded at each z-plan and image stacks (120-nm increment along z axis) were acquired. The 3D stacks were then computationally reconstructed with the ZEN imaging software package (algorithm of Heintzmann and Cremer (Heintzmann and Cremer, 1999)) to generate super-resolution 3D SIM (SR-SIM) images with twofold extended resolution in the three axes (reconstructed image format = 1904 x 1900 pixels, representing voxels of 0.04 x 0.04 x 0.12 µm).

Image quantification

Images were analyzed and quantified using the Spot Detector plugin of Icy (biological images analysis suite; <http://icy.bioimageanalysis.org>) (de Chaumont et al., 2012). This plugin identifies subcellular organelles such as endosomes and measures their areas in 2D images or their volumes in 3D images using an undecimated wavelet transform (Corlier et al., 2015). For quantification of fluorescent immunohistochemistry images of Ts65Dn mice, each image included various cell types. Cholinergic and non-cholinergic neurons were identified respectively by the ChAT and NeuN immunolabellings, allowing the definition of regions of interest (ROI) for further characterization of early endosomes. For neurons derived from iPSCs, a ROI was delineated around the cell bodies labelled with MAP2 or β3-tubuline immunolabellings, on the z-plan where the soma appeared as the largest.

Statistical analysis

Data extracted from Icy were analyzed with Statistica and GraphPad Prism.

Comparison of the mean area or volume of early endosomes

We tested the genotype effect on the size of early endosomes imaged by EM and confocal microscopy in LCLs, brains from Ts65Dn mice and human neurons derived from iPSCs using a mixed effects nested analysis of variance (ANOVA), the random cell factor being nested in the random individual factor, itself nested in the fixed genotype factor. Thus, we could test a global difference of early endosome size between genotypes despite the important variability of mean early endosome size and number between cells and individuals. When required for the normality and homoscedasticity assumptions to be true, size measures were analyzed after logarithmic transformation.

Comparison of the mean number of early endosomes

For LCLs, we directly compared the mean number of early endosomes per cell using a nested mixed effect ANOVA, the random individual factor being nested in the fixed genotype factor. In neurons derived from iPSC, the volume of the soma varies importantly between neurons and is hardly measurable. To consider the size of each cell in the analysis, we divided the number of early endosomes per cell by the ROI area (see above). Furthermore, euploid and DS cells coming from a single mosaic individual, there is no individual effect. Thus, following conclusive Shapiro-Wilk test for normality, the number of early endosomes adjusted to the ROI area (number/ μm^2) was compared between genotypes using Welch's test.

Comparison of early endosome size distribution

To compare the distribution of early endosome size between genotypes, we classified early endosomes in three size categories: small (area or volume inferior to the median value), medium (area or volume between the median value and the ninth decile) and large (above the ninth decile). The bounds of the size categories were established on the euploid condition distribution (except for LCLs from individuals with DS vs. DS+AD, where the control

condition is DS) and then used for the other conditions. The proportions of small, medium and large endosomes were compared between conditions using a chi-square test.

Results

Electron microscopy (EM) revealed clusters of normal-sized EEA1-positive early endosomes in LCLs and fibroblasts from individuals with DS

Using confocal microscopy, we have previously shown that LCLs from individuals with DS contained enlarged EEA1- and Rab5-positive early endosomes as compared to euploid individuals (Cossec et al., 2012). The limit of resolution of conventional light microscopy being in the diameter range of early endosomes, we wished to analyze the ultrastructure of early endosomes using EM. We imaged serial 50-70 nm-thick sections, allowing three dimensional observation and measurement of endosomal structures. EEA1 electron-dense DAB precipitates were found surrounding the cytoplasmic leaflet of early endosome membranes and extending at a few nanometers from endosome profiles, which correspond to their association with filamentous materials as described in a previous ultrastructural study (Wilson et al., 2000).

Surprisingly, LCLs from individuals with DS displayed abnormally clustered EEA1-positive early endosomes (Fig. 1). Observation of serial sections enabled to clearly identify clustered early endosome profiles that were fully disconnected from one another and distinct from smaller surrounding tubule or vesicular profiles (Fig. 1a, b; suppl. Fig. 1). These clusters of early endosomes had a diameter of approximately 1 μm , as illustrated by the pseudo-colored halos (Fig. 1c). Interestingly, this diameter range corresponded to measures of enlarged endosomes previously described with non-super-resolution optical microscopy (Cossec et al., 2012). Occasional presence of intraluminal vesicles (ILVs) in EEA1-positive early endosomes evoking multivesicular body-like vesicles is discussed below.

Morphometric analysis revealed that mean early endosome areas were not significantly different between LCLs from euploid individuals ($n = 28$ cells, mean area = $0.0538 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0037) and individuals with DS ($n = 43$ cells, mean area = $0.0473 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0078) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.566) (Fig.

1e). Early endosome clusters were occasionally observed in LCLs from euploid individuals but at lower incidence and with less endosomes involved than in LCLs from individuals with DS.

Additionally, we assessed whether AD pathology could have an additive effect on the endosomal phenotype in DS. Thus, we analyzed early endosomes in LCLs from individuals with DS and AD by confocal microscopy (suppl. Fig. 2). Since the *APOE* $\epsilon 4$ allele identified as a major genetic risk factor for AD (Saunders et al., 1993, Strittmatter et al., 1993) is known to influence the size of early endosomes (Cataldo et al., 2000), we genotyped all LCLs. One *APOE* $\epsilon 4$ allele was present in 1 out of 7 individuals with DS without AD, and 2 out of 7 individuals with DS + AD (Suppl. Table 1).

As illustrated in Suppl. Fig. 2a, the mean early endosome volume was not significantly different between LCLs from individuals with DS without AD ($n = 7$ individuals, mean volume = $0.2768 \mu\text{m}^3$, SEM ± 0.0081) and LCLs from individuals with DS + AD ($n = 7$ individuals, mean volume = $0.2992 \mu\text{m}^3$, SEM ± 0.0137) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.293) (suppl. Fig. 2b). There was no difference in the mean number of early endosomes per cell between LCLs from individuals with DS without AD (mean number/cell = 28.84, SEM ± 1.908) and individuals with DS + AD (mean number/cell = 25.31, SEM ± 2.171) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.245) (suppl. Fig. 2c). Early endosome distribution in size categories revealed no difference in the proportion of medium early endosomes between LCLs from individuals with DS with or without AD (40 % in both conditions). Small early endosomes were less abundant in LCLs from individuals with DS + AD as compared to LCLs from individuals with DS without AD (DS = 50 %, DS+AD = 47 %). Conversely large early endosomes were more abundant in LCLs from individuals with DS + AD as compared to LCLs from individuals with DS only (DS = 10 %, DS+AD = 13 %) (chi-square p-value < 0.0001) (suppl. Fig. 2d). These data indicate a trend toward an increase in size and a decrease in number of early endosomes between LCLs from individuals with DS with and without AD, but not reaching significance. Thus, we conclude that in LCLs, AD pathology in addition to trisomy 21 does not significantly worsen early endosome enlargement.

We next explored early endosome ultrastructure in fibroblasts from individuals with DS, in which we and others previously observed an increase in early endosome volume by confocal microscopy (Cataldo et al., 2008, Cossec et al., 2012, Jiang et al., 2010). EM of EEA1-immunolabelled fibroblasts from individuals with DS indeed showed

large clusters of early endosomes (Fig. 2). Again, ILVs could be observed in clustered early endosomes. Small clusters of early endosomes could also be occasionally observed in fibroblasts from euploid individuals.

Thus, ultrastructural imaging evidence that early endosomes formerly described as enlarged in LCLs and fibroblasts from individuals with DS are rather clustered early endosomes of normal size which cannot be discriminated by conventional immunofluorescence imaging.

Early endosomes were prone to form clusters in cholinergic neurons of the Ts65Dn mouse model of DS

Next we sought early endosome ultrastructural alterations *in vivo*. Basal forebrain cholinergic neurons (BFCNs) show age-related degeneration in both AD and DS which may be caused by extracellular accumulation of A β or intracellular aggregation of hyperphosphorylated Tau and are responsible for cognitive impairments (Baker-Nigh et al., 2015, Baskin et al., 1999, Geula et al., 2008). Ts65Dn mice also display age-related degeneration of BFCNs at 5-6 months of age (Holtzman et al., 1996, Seo and Isacson, 2005). In addition, endosomal enlargement was qualitatively described in Ts65Dn mice (Cataldo et al., 2003, Jiang et al., 2016). To quantitatively confirm early endosome enlargement by confocal microscopy, we immunolabelled early endosomes using anti-EEA1 antibody in BFCNs identified using an anti-choline-acetyltransferase (ChAT) antibody in 4-month-old euploid and Ts65Dn mice, before age-related BFCNs loss (Fig. 3a). All measurements were performed in the somatic cytoplasm, at the equatorial section of cell bodies. We found that the mean early endosome area was significantly higher in BFCNs from Ts65Dn mice ($n = 5$ mice, mean area = $0.137 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0075) as compared to BFCNs from euploid mice ($n = 4$ mice, mean area = $0.1159 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0185) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.043) (Fig. 3a, b). Early endosome area distribution showed an increased proportion of medium (euploid = 40 %, Ts65Dn = 44 %) and large early endosomes (euploid = 10 %, Ts65Dn = 18 %) along with a decreased proportion of small early endosomes (euploid = 50 %, Ts65Dn = 38 %) in Ts65Dn mice as compared to euploid mice (chi-square p-value < 0.0001) (Fig. 3c). We then analyzed early endosome area in non-cholinergic (ChAT-negative) neurons (NeuN-positive) of the septal area, not known to degenerate. The mean early endosome area was not significantly different in non-cholinergic neurons of the septal area between euploid mice ($n = 4$ mice, mean area = $0.0873 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0118) and Ts65Dn mice ($n = 5$ mice, mean area = $0.114 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0081) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.214) (suppl. Fig. 3a). In addition, we measured early endosome area in cholinergic neurons from the dorsal striatum (caudoputamen), a region in which cholinergic neurons are not known to degenerate in DS or AD (Boissiere et al., 1997, Lehericy et al., 1989). The mean early endosome area was not significantly different in striatal cholinergic neurons from euploid mice ($n = 4$ mice, mean area = $0.083 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0089)

when compared to those from Ts65Dn mice ($n = 5$ mice, mean area = $0.0955 \mu\text{m}^2$, SEM ± 0.0084) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.666) (suppl. Fig. 3b).

Altogether, these data obtained by confocal microscopy quantitatively confirm early endosome enlargement in BFCNs of 4-month-old Ts65Dn mice. We also show that this enlargement is restricted to the septal cholinergic system. Early endosomes are not significantly enlarged in non-cholinergic neurons of the basal forebrain and cholinergic neurons of the dorsal striatum.

To test whether early endosomes are prone to form clusters *in vivo*, we analyzed at the ultrastructural level EEA1-positive early endosome morphology in gold-labelled ChAT-positive BFCNs in 4-month-old euploid and Ts65Dn mice (Fig. 3d, e, f). Eleven cholinergic neurons in a Ts65Dn mouse were studied along serial sections through a $1 \mu\text{m}$ thickness where 20 endosome clusters containing two to three individual endosomes were found, with a mean ratio of 1.82 clusters per cholinergic neuron. As a comparison, we analyzed 20 cholinergic neurons in an euploid littermate along serial sections through a $1.32 \mu\text{m}$ thickness, and found a total number of 14 clustered early endosomes, with a mean ratio of 0.7 clusters per cholinergic neuron. Thus, we found a 2.6-fold increase of endosomal cluster occurrence in BFCNs of the Ts65Dn mouse as compared to BFCNs of the euploid littermate. We also measured the diameter of the 75 biggest early endosomes encountered, and found that early endosomes showed a tendency to enlargement in the Ts65Dn mouse as compared to those of the euploid mouse. Abnormal early endosome clustering is hence observed specifically in BFCNs of the Ts65Dn mouse, indicating that early endosomes are prone to clustering in the brain of a DS mouse model, before BFCNs degeneration.

Confocal microscopy shows abnormal enlargement of early endosomes in isogenic human neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) from an individual with mosaic trisomy 21

We questioned whether early endosome morphological abnormalities could be found in human neurons derived from induced pluripotent stem cells (iPSC) clones from an individual with mosaic trisomy 21 (Murray et al., 2015), allowing direct comparison between isogenic non-trisomic (euploid) and trisomic (T21) conditions.

By confocal microscopy, the early endosome volume was significantly increased in T21 neurons ($n = 23$ cells, mean volume = $0.2541 \mu\text{m}^3$, SEM ± 0.0278) as compared to euploid neurons ($n = 33$ cells, mean volume = $0.1281 \mu\text{m}^3$, SEM ± 0.0073) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.0042) (Fig. 4a, b). This result provides the first evidence for abnormal early endosome enlargement in DS human iPSC-derived neurons. In T21 neurons, the early endosome size distribution revealed a decrease in the proportion of both small (euploid = 50 %, T21 = 49 %) and medium early endosomes (euploid = 40 %, T21 = 35 %), along with an increase

in the proportion of large early endosomes when compared to euploid neurons (euploid = 10 %, T21 = 16 %) (chi-square p-value < 0.0001) (Fig. 4c). In addition, the number of early endosomes adjusted to the ROI area (cell body area on the z-plan where it appeared as the largest) shows no significant difference between euploid (n = 23 cells, mean number/ROI area = 0.958 early endosomes/ μm^2 , SEM $\pm$ 0.0473) and T21 neurons (n = 33 cells, mean number/ROI area = 1.0488 early endosomes/ μm^2 , SEM $\pm$ 0.0666) (Welch's test p-value = 0.272) (Suppl. Fig 4a). These results indicate that in T21 neurons, early endosomes are larger on average as compared to euploid neurons and that this cellular model of human neurons can recapitulate the endosomal phenotype in DS.

In order to get insight into the ultrastructure of early endosomes in T21 neurons derived from iPSCs, we performed EM imaging. Fig. 4d and e illustrate that EEA1-labelled early endosomes from T21 neurons formed clusters, again supporting that apparently enlarged early endosomes observed by confocal microscopy actually correspond to clusters of early endosomes.

Super-resolution microscopy reveals clusters of normal-sized early endosome in human trisomic iPSCs-derived neurons

We performed optical super-resolution imaging of fluorescently-labelled early endosomes of the human neuronal model of DS using super-resolution Structured Illumination Microscopy (SR-SIM) (Fig. 5a-d). The SR-SIM microscope displays a lateral resolution of 100 nm, suited for observation and discrimination of adjoining early endosomes. Morphometric analysis revealed that the mean early endosome volume was not significantly different between euploid (n = 20 cells, mean volume = $0.0091 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm$ 0.00038) and T21 neurons (n = 17 cells, mean volume = $0.0096 \mu\text{m}^3$, SEM $\pm$ 0.00035) (mixed effects ANOVA, genotype p-value = 0.059) (Fig. 5e). The distribution of early endosomes in size categories revealed a similar repartition between small, medium and large size categories in euploid and T21 neurons. A slight increase in the proportion of medium-sized endosomes in T21 neurons (42 % vs. 40 % in euploid neurons) was likely responsible for the significant difference between euploid and T21 endosome size distribution (chi-square p-value < 0.0001) (Fig. 5f). Fig. 5g illustrates a large early endosome in non-SR widefield microscopy corresponding to a cluster of 5 normal-sized early endosomes in SR-SIM showed in Fig. 5h. SR-SIM hence provides evidence of early endosome clustering in human trisomic neurons. Moreover, SR-SIM enables to image early endosome clusters in 3 dimensions revealing that early endosomes are disjoined from one another (Fig. 5g, h), as observed previously by EM in LCLs from individuals with DS (Fig. 1, suppl. Fig. 1). We quantified the number of early endosomes adjusted to the ROI area in SR-SIM images and found no significant difference between euploid (n = 20 cells, mean number/ROI area = 0.8508 early

endosomes/ μm^2 , SEM $\pm$ 0.1027) and T21 neurons (n = 17 cells, mean number/ROI area = 1.1562 early endosomes/ μm^2 , SEM $\pm$ 0.1231) (Welch's test p-value = 0.066) (Suppl. Fig 4b). Together, these data confirm that enlarged early endosomes observed by confocal microscopy in trisomic neurons derived from iPSCs correspond to clusters of adjacent normal-sized early endosomes.

Discussion

Early endosome enlargement in DS and AD has been characterized over the past two decades using conventional light microscopy at a resolution of 200 nm at best, corresponding to the actual size of these subcellular organelles (Cataldo et al., 2001, Cataldo et al., 1997, Cataldo et al., 2008, Cataldo et al., 2003, Cataldo et al., 2004, Cataldo et al., 2000, Corlier et al., 2015, Cossec et al., 2012, Cossec et al., 2010a, Salehi et al., 2006). In order to take a closer look at the early endosomal compartment in the DS condition, we made ultrastructural observations by EM and used super-resolution SIM to uncover that various DS cell types actually displayed clustered early endosomes, hitherto described as enlarged early endosomes. In this study, we revisited early endosome morphological alterations in cellular models of DS (LCL, fibroblasts), in the brain of Ts65Dn mice and in human neurons derived from iPSC from an individual with mosaic trisomy 21. In all cell types analyzed, clusters containing individualized EEA1-labelled early endosomes were identified by EM. SR-SIM confirmed this result in neurons derived from iPSC.

LCLs and fibroblasts from individuals with DS observed by EM contained clusters of early endosomes with about ten endosomes per cluster (Fig. 1; Fig. 2; supp. Fig. 1). Early endosome size varied between cell types with nearly 10-fold larger area measured by EM in fibroblasts when compared to LCLs. Nevertheless clusters were present in both cell types suggesting that clustering could encompass endosomes of various sizes. Increase in the volume of EEA1-labelled fluorescent endosomes in DS condition was more pronounced in fibroblasts (34 %) and peripheral blood mononuclear cells (31%) than in LCLs (8 %) (Cossec et al., 2012). Further analysis of early endosomes in LCLs from individuals with DS and with AD type dementia did not reveal significant differences with individuals with DS without AD. Thus, AD condition in individuals with DS does not have an additional effect on the size of EEA1-labelled endosomes, indicating that the maximum size and/or clustering of early endosomes is fundamentally limited in DS pathological context.

Having identified endosomal clusters in DS in two types of cells from the periphery (LCLs and fibroblasts), we then wondered whether neurons in the central nervous system would also contain the same type of clusters. Thus, we analyzed brain sections from 4-month-old Ts65Dn mice where endosomal abnormalities had been qualitatively described earlier, mostly in the basal forebrain (Cataldo et al., 2003, Jiang et al., 2016). Morphometric analysis using confocal microscopy confirmed the presence of early endosomes with a significantly higher area (18 % on average) in BFCNs. Non-cholinergic neurons of the septal area as well as striatal cholinergic neurons did not contain enlarged endosomes. Taken together, these results support that increase in the area of early endosomes

detected by confocal microscopy is cell-type and brain-region specific. BFCNs survival has been shown to be highly dependent on endosome-mediated retrograde transport of neurotrophins such as neural growth factor (NGF) (Bronfman et al., 2007). Among other deregulations, endosome changes and altered trafficking of NGF induced by APP overexpression could be implicated in BFCNs degeneration in Ts65Dn mice (Cooper et al., 2001, Delcroix et al., 2003, Salehi et al., 2006). Using EM we found a 2.6-fold increased occurrence of endosomal clusters in BFCNs from Ts65Dn mice as compared to the euploid littermate, revealing that previously described enlarged endosomes *in vivo* actually correspond to clustered early endosomes. As compared to LCLs and fibroblasts in which we observed clusters containing numerous individual early endosomes, clusters observed by EM in BFCNs from Ts65Dn mice appeared to be mostly composed of pairs or triplets of endosomes.

We hence identified early endosome clustering in peripheral cells from individuals with DS as well as in neurons from a mouse model of DS. Since it is hardly possible to obtain high quality EM images from fixed human *post-mortem* brain samples, we explored the endosomal compartment in human neurons derived from iPSC clones obtained from an individual with mosaic DS. Euploid and T21 clones were analyzed first by confocal microscopy and then by EM and super-resolution SIM with the invaluable advantage for these clones to be isogenic except for the presence of an additional HSA21. We found a significant increase of the mean volume of early endosomes by confocal microscopy which was more pronounced (98 %) than in human LCLs and fibroblasts from individuals with DS or neurons from the Ts65Dn mice. Thus, we validate the use of neurons derived from human T21 iPSCs as an accurate model for the study of endosomal abnormalities in DS. This result is consistent with a previous study reporting the presence of qualitatively enlarged early endosomes in iPSC-derived neurons from individuals with sporadic AD (Israel et al., 2012). As in LCLs and fibroblasts, ultrastructural examination by EM of euploid and T21 human neurons revealed that apparently enlarged early endosomes are actually clusters of normal-sized endosomes. Further super-resolution imaging using SIM confirmed the presence of clusters of endosomes with unchanged volume in T21 neurons as compared to euploid neurons. The number of early endosomes / ROI area is increased by 9% in T21 neurons imaged by confocal microscopy and by 36% in T21 neurons imaged by SR-SIM and. This increased proportion in T21 neurons images by SR-SIM as compared to confocal microscopy is due to the detection of individual clustered early endosomes, undetectable by confocal imaging.

While we noticed an important variability of early endosome size range among cell types, clustering occurred in all types of cells analyzed so far.

Role of Rab5 in the formation of enlarged endosomes in DS

Rab5 is a GTPase implicated in the fusion of newly formed endocytic vesicles and early endosomes, as well as in homotypic fusion between early endosomes (Stenmark et al., 1994). Rab5 or constitutively active (GTP-bound) mutated Rab5 over-expression increases endocytosis thus producing giant endosomes (Bucci et al., 1992, Roberts et al., 1999, Stenmark et al., 1994), confirmed by ultra-structural analysis (Wegner et al., 2010). It was hypothesized that endosomal enlargement in DS and AD could be related to a dysregulation in the Rab5-GTP/Rab5-GDP balance. Several lines of evidence suggest that higher APP gene dosage causing increased expression of β -CTF could be responsible for early endosome enlargement in DS (Jiang et al., 2010). Higher levels of β -CTF would stimulate APPL1 recruitment to early endosomes thereby stabilizing the GTP-bound form of Rab5 and promoting endosomal fusion (Kim et al., 2016). Additionally, abnormal Rab5 activation found in Ts65Dn mice due to increased APP and β -CTF expression would disrupt NGF axonal transport involved in BFCNs degeneration (Xu et al., 2016). In this study, irregularly shaped enlarged early endosomes in cultured BFCNs from Ts65Dn mice were described. They could correspond to early endosome clusters. We are currently testing alternative mechanisms to unravel the cause of clustering, especially considering that EM imaging of giant early endosomes induced by Rab5-GTP overexpression (Wegner et al., 2010) shows a clearly distinct morphology as compared to the ultrastructure of early endosomes observed by EM and SIM in DS in the present study. We thus suspect that endosome clustering could rather be a cause of Rab5 over-activation, compensating the fusion defects by modifying the Rab5-GDP/GTP balance toward the GTP-bound state.

Clustering of early endosomes could result from increased endocytosis and traffic jam

Increased endocytosis which has been shown in fibroblasts from individuals with DS (Jiang et al., 2010) could lead to an excessive number of endosomes which would impair their transport and cause “traffic jam”. Interestingly we also found that early endosome enlargement and clustering can be triggered by an increase of cholesterol load in the plasma membrane which stimulates APP endocytosis (Cossec et al., 2010a, Marquer et al., 2011, Marquer et al., 2014). The present study cannot conclude on the dynamics of endocytosis in the different cell types analyzed although the high variability in the size and number of early endosomes per cell suggests that the dynamic of endocytosis is different according to cell types.

In iPSC-derived neurons there was no significant change in the number of early endosomes / ROI area either by confocal microscopy or by SIM between euploid and T21 conditions. However, the number of early endosomes / ROI area tended to increase in T21 neurons as compared to control by both confocal microscopy

(9%) and by SR-SIM (36%) suggesting in that endocytosis could be increased in T21 neurons derived-from iPSCs. Additional studies of endocytosis dynamic in cellular models of DS will unravel whether variations in the rate of endocytosis may be a cause of early endosome clustering.

Clustering of early endosomes could result from a defect of maturation

Early endosome clustering could result from maturation defects. Cargos carried by early endosomes are sorted through several potential pathways: to the plasma membrane through recycling endosomes, to the trans-Golgi network through retromers or to degradation through late endosomes/multivesicular bodies (MVBs) and lysosomes. Early endosome maturation to late endosomes operates by a conversion from Rab5 to Rab7 (Poteryaev et al., 2010) as well as a concomitant acidification dependent on vacuolar H⁺-ATPases and regulated by K⁺ and Cl⁻ influx (Mindell, 2012). Late endosomes/MVBs eventually fuse with lysosomes where the pH is very acidic and cargos can be degraded by acid hydrolases (Hu et al., 2015). Acidification of the lumen of vesicles and intraluminal Ca²⁺ concentration appear to be essential for proper endosome maturation and lysosome functioning (Pillay et al., 2002, Pryor et al., 2000, Tjelle et al., 1996).

Alterations have been found downstream of the endo-lysosomal pathway in DS and AD. Rab7, another member of the Rab-GTPase regulating factors of vesicle transport, was up-regulated in DS and AD (Cataldo et al., 2008, Cataldo et al., 2004, Cataldo et al., 2000, Ginsberg et al., 2011, Ginsberg et al., 2010b). Additionally, lysosomal acidification defects and disrupted autophagy were described in DS (Cataldo et al., 2004, Colacurcio and Nixon, 2016, Lee et al., 2010). Which compartment is modified first is not clear. It has not been determined if the initial alteration causes a succession of changes on other subcellular organelles or if all changes observed are independent. In the present study we observed by EM EEA1-labelled endosomes containing intraluminal vesicles in LCLs, fibroblasts from individuals with DS (Fig. 1a, b, d and 2b, c) and in BFCNs from the Ts65Dn mice (Fig. 3f) indicating the presence of MVBs-like organelles in the endosomal clusters. Clusters made of early endosomes and MVBs might reveal a problem of maturation of early endosomes.

Clustering of early endosomes could result from a defect of fusion of early-endosomes involving phosphatidylinositol phosphates or the ATPase p97

Beyond increased endocytosis or endosomal maturation defect as a cause of early endosome clustering, alterations in endosomal fusion could also be involved. Phosphatidylinositol phosphates (PIPs) are implicated in various signaling processes, vesicular trafficking, and have an emerging role in AD pathogenesis (Waugh, 2015).

Phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) has a major role in early endosome fusion since dysregulation of PI3P hinders fusion between vesicles. Phosphatidylinositol-3 kinase (PI3-kinase) phosphorylates PI3 to PI3P and is activated by Rab5-GTP thereby promoting the assembly of PIP3 with Rab5 and Rab5 effectors via FYVE-motives (Christoforidis et al., 1999, Gaullier et al., 1998, Nielsen et al., 2000, Simonsen et al., 1998, Stenmark et al., 1996). PI3P levels are decreased in the brain of patients with LOAD and silencing of the PI3-kinase Vsp34 leads to APP processing dysfunction in endosomes (Morel et al., 2013). This study unveils a paradox between PI3P deficiency and Rab5 activation in AD, as Rab5-GTP is known to activate Vps34 and thus PI3P production (Christoforidis et al., 1999). In light of recent findings showing that APP binds PIKfyve, the kinase that phosphorylates PI3P to PI(3,5)P (Balklava et al., 2015, Currinn et al., 2016), APP and PIPs interaction can be suspected to cause endosome clustering. Indeed APP binding to PIKfyve leads to an over-production of PI(3,5)P₂, which has been shown to negatively regulate fusion between early endosomes (Ikononov et al., 2001, Ikononov et al., 2006, Sbrissa et al., 2007). In DS, APP over-expression could promote PIKfyve activation and thereby lower PI3P level. Fusion deficits caused by a lack of PI3P would make early endosomes prone to clustering. In this scenario a feedback loop would activate Rab5 to compensate fusion deficiency.

We previously demonstrated synaptojanin1 (SYNJ1) involvement in early endosome alterations in DS (Cossec et al., 2012). The *SYNJ1* gene encoding SYNJ1 maps to HSA21 and is overexpressed in DS (Arai et al., 2002). SYNJ1 is a phosphatase that dephosphorylates PI(4,5)P₂ and is implicated in clathrin-mediated endocytosis (Mani et al., 2007). Down-regulation of SYNJ1 reversed endosomal enlargement in fibroblasts from individuals with DS (Cossec et al., 2012), improved A β clearance and memory deficits in Ts65Dn mice (Voronov et al., 2008) and in AD mouse model (Zhu et al., 2013). It remains to be shown whether increase in SYNJ1 expression leads to endosomal clustering as observed in DS in the present study.

Alternatively to PIPs dysregulation, the ATPase p97 activity could also be involved in early endosome clustering. Indeed p97 regulates EEA1 dimerization, thereby modifying the formation of functional EEA1 tethering complex and membrane fusion (Ramanathan and Ye, 2012). Because p97 level is elevated in the serum of AD patients (Feldman et al., 2001, Kennard et al., 1996), we can hypothesize that dysregulation of p97 in AD might thereby lead to early endosome fusion imbalance and endosome clustering.

In conclusion our work highlights the significance of early endosome dysfunction in DS and reveals a phenotype which remained ignored due to the lack of resolution of conventional light microscopy. Using the resolving power of EM and SIM suited to the study of the endosomal compartment, we could show that previously described

enlarged endosomes in DS actually corresponded to clusters of normal-sized endosomes. These fundamental results question the use of confocal microscopy for the description of subcellular compartments such as endosomes in disease conditions. The refined phenotype established here suggests new mechanisms that could rely on either defects of trafficking, maturation or fusion of endosomes involving molecules such as PIPs. The presence of endosomal clusters will need to be assessed in other disease conditions with endosomal dysfunctions such as AD. Whatever the mechanism of formation of these clusters of endosomes, we know from previous studies that endosomal dysfunction has major consequences on APP processing, protein trafficking and more generally on cellular functioning. New understanding of the selective mechanisms involved in endosomal dysfunction could

lead to the development of drugs able to modulate A β secretion, one of the most widely accepted target in AD therapeutic research [68].

Figure captions

Fig. 1 Ultrastructural imaging of early endosomes in LCLs from individual with DS reveals clusters of normal-sized early endosomes. **a,b** 2 serial TEM sections of an EEA1 immunoperoxidase-labelled cluster of early endosomes in a trisomic lymphoblastoid cell. Scale bars = 1 μm **c,d** 2 clusters of early endosomes in a lymphoblastoid cell from an individual with DS. The pseudo-colored red halo suggests the extent of labelled area as it should appear with confocal analysis. The squared zone in c is enlarged in d. Scale bar in (c) = 2 μm , scale bar in (d) = 1 μm **e** Quantification of early endosome area in LCLs imaged by TEM, showing no significant difference in mean early endosome area between LCLs from euploid individual and individual with DS (mixed effects ANOVA, ns, genotype, p-value = 0.566)

Fig. 2 Electron micrograph of EEA1 immunoperoxidase labelled fibroblast from an individual with DS. The two squared zones in (a) are magnified in (b) and (c) respectively. In (a), N indicates the nucleus. Scale bar (a) = 10 μm , scale bar in (b,c) = 1 μm

Fig. 3 Confocal microscopy confirms early endosome enlargement in BFCNs from 4-month-old Ts65Dn mice and TEM shows clustering of early endosomes. **a** Representative confocal images of DAPI (blue), ChAT (red), EEA1 (green) labelling and overlay in BFCNs from WT and Ts65Dn mice. For clarity, NeuN staining is not shown. Scale bar = 10 μm **b** Quantification of early endosome surface at equatorial section of BFCNs shows a significant increase in mean early endosome area in Ts65Dn mice as compared to WT mice (mixed effects ANOVA, genotype *p-value = 0.043) **c** Distribution of early endosome size reveals a higher proportion of large and medium-sized early endosomes and a smaller proportion of small early endosomes in BFCNs from Ts65Dn mice as compared to BFCNs of euploid littermates (chi-square, ****p-value < 0.0001). Size categories bounds (μm^2): small [0.018; 0.0601]; medium]0.0601; 0.2282] and large]0.2282; + ∞ [**d** Low magnification micrograph of a ChAT gold-labelled BFCNs of a Ts65Dn mouse. Early endosomes are labelled by an EEA1-DAB precipitate. The soma profile is pseudo-colored in yellow for clarity. N indicates the nucleus and asterisks show two lamellar bodies, an organelle specifically found in cholinergic neurons. The squared zone is enlarged in (e) showing an isolated DAB-EEA1 labelled endosome and a cluster of at least 2 endosomes, the latter being magnified in (f). Scale bar in (d) = 1 μm , (e) = 500 nm, (f) = 200 nm

Fig. 4 Imaging of human iPSCs-derived neurons from an individual with mosaicism for trisomy 21 shows EEA1-positive early endosome enlargement by confocal microscopy and clustering by TEM in T21 neurons as compared to euploids. **a** Confocal z-projected representative images of DAPI (blue), MAP2 (red), EEA1 (green) labelling and overlay in euploid and T21 iPSCs-derived neurons. Scale bar = 10 μm **b** Mean early endosome volume is significantly increased in T21 neurons as compared to euploid neurons (mixed effects ANOVA, genotype **p-value = 0.0042) **c** Early endosome size distribution shows that T21 neurons have a higher proportion of large endosomes, and a decreased proportion of both small and medium endosomes when compared to euploid neurons (chi-square, ****p-value < 0.0001). Size categories bounds (μm^3): small [0.0182; 0.066]; medium [0.066; 0.2583] and large [0.2583; + ∞] **d** Electron micrographs of clustered EEA1-positive early endosomes revealed with DAB in a T21 neuron, magnified in (e). N indicates the nucleus. Scale bar in (d) = 10 μm , (e) = 500 nm

Fig. 5 Super-resolution SIM confirms EEA1-positive early endosome clustering in trisomic 21 human iPSCs-derived neurons **a-d** Examples of DAPI (blue), β 3-tubulin (red), EEA1 (green) labelling and overlay in non-SR widefield microscopy (a,c) and SR-SIM (b,d) of a euploid neuron (a,b) and a T21 neuron (c,d). Scale bar = 10 μm **e** Quantification of early endosome volume by SR-SIM images shows no significant difference between T21 and euploid neurons (mixed effects ANOVA, ns, genotype p-value = 0.059) **f** Early endosome size distribution shows that T21 neurons have a lower proportion of both small and large endosomes, and a higher proportion of medium endosomes when compared to euploid neurons (chi-square, ****p-value < 0.0001). Size categories bounds (μm^3): small [0.00132; 0.00718]; medium [0.00718; 0.02041] and large [0.02041; + ∞] **g,h** Serial images of a large early endosome from a T21 neuron imaged in non-SR widefield microscopy (g) and by SR-SIM showing a direct and 3-dimensional correspondence between a large early endosome in non-SR widefield and clustered early endosomes by SR-SIM. Individual images z-section is 0.12 μm , series of 6 adjoining images represent a total z-section of 0.72 μm . Scale bar = 500 nm

Figure captions - Supplementary figures

Suppl. Fig. 1 A cluster of EEA1-DAB labelled endosomes in a LCL cell from an individual with DS. Electron micrographs along 8 serial 50 nm-thick sections. Note that sections 3 and 6 are missing. Individual endosomes are identified by differently colored dots, and most of them can be seen in 2 successive sections. The cluster contains at least 17 distinct endosomes and would appear as polycyclic if it was fluorescently labelled. Note that the DAB precipitate accumulating around surrounding small vesicles makes them appear as pseudo-coated. Scale bar for all micrographs = 500 nm

Suppl. Table 1 Characteristics of LCLs from individuals with DS and individuals with DS + AD, including ApoE genotypes

Suppl. Fig. 2 Morphometric analysis of early endosomes reveals similar features between LCLs from individuals with DS without AD and those with DS + AD. **a** Confocal microscopy maximum z-projected representative images of DAPI (blue), EEA1 labelling of early endosomes (green), and overlay in LCLs from individuals with DS and individuals with DS + AD. Scale bar = 5 μm **b** Mean early endosome volume is not significantly different between LCLs from individuals with DS and individuals with DS + AD (mixed effects ANOVA, ns, genotype p-value = 0.293) **c** The mean number of early endosome per cell is not significantly different between LCLs from individuals with DS and those with DS + AD (mixed effects ANOVA, ns, genotype p-value = 0.245) **d** Early endosome distribution is significantly different between LCLs from individuals with DS and those with DS + AD (chi-square, ****p-value < 0.0001). Size categories bounds (μm^3): small [0.0187; 0.1928]; medium]0.1928; 0.5554] and large]0.5554; + ∞ [

Suppl. Fig. 3 Early endosomes are not altered in other neuronal types from Ts65Dn brain **a** Mean early endosome area is not significantly different in non-cholinergic neurons from the MSN of Ts65Dn mice as compared to WT mice (mixed effects ANOVA, ns, genotype p-value = 0.214) **b** Mean early endosome area is not significantly different in striatal cholinergic neurons of Ts65Dn mice as compared to WT mice (mixed effects ANOVA, ns, genotype p-value = 0.666)

Suppl. Fig. 4 Quantification of the number of early endosomes in two sets of neurons derived from iPSCs observed by confocal microscopy (a) and SR-SIM (b). **a** By confocal microscopy, quantification of early endosome number adjusted to neurons cell body area reveals no significant difference between euploid and T21 neurons (Welch's test, ns, p-value = 0.272) **b** By SR-SIM, quantification of early endosome number adjusted to neurons cell body area reveals no significant difference between euploid and T21 neurons (Welch's test, ns, p-value = 0.066)

Conflict of interest

The authors declare that they have no conflict of interest.

References

1. Arai Y, Ijuin T, Takenawa T, Becker LE, Takashima S (2002) Excessive expression of synaptojanin in brains with Down syndrome. *Brain Dev* 24:67-72
2. Baker-Nigh A, Vahedi S, Davis EG, Weintraub S, Bigio EH, Klein WL, Geula C (2015) Neuronal amyloid-beta accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain* 138:1722-1737. doi:10.1093/brain/awv024
3. Balklava Z, Niehage C, Currinn H, Mellor L, Guscott B, Poulin G, Hoflack B, Wassmer T (2015) The Amyloid Precursor Protein Controls PIKfyve Function. *PLoS One* 10:e0130485. doi:10.1371/journal.pone.0130485
4. Baskin DS, Browning JL, Pirozzolo FJ, Korporaal S, Baskin JA, Appel SH (1999) Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol* 56:1121-1123
5. Beyreuther K, Pollwein P, Multhaup G, Monning U, Konig G, Dyrks T, Schubert W, Masters CL (1993) Regulation and expression of the Alzheimer's beta/A4 amyloid protein precursor in health, disease, and Down's syndrome. *Ann N Y Acad Sci* 695:91-102
6. Boissiere F, Faucheux B, Agid Y, Hirsch EC (1997) Choline acetyltransferase mRNA expression in the striatal neurons of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci Lett* 225:169-172
7. Bronfman FC, Escudero CA, Weis J, Kruttgen A (2007) Endosomal transport of neurotrophins: roles in signaling and neurodegenerative diseases. *Dev Neurobiol* 67:1183-1203. doi:10.1002/dneu.20513
8. Bucci C, Parton RG, Mather IH, Stunnenberg H, Simons K, Hoflack B, Zerial M (1992) The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell* 70:715-728
9. Cataldo A, Rebeck GW, Ghetri B, Hulette C, Lippa C, Van Broeckhoven C, van Duijn C, Cras P, Bogdanovic N, Bird T, Peterhoff C, Nixon R (2001) Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders. *Ann Neurol* 50:661-665
10. Cataldo AM, Barnett JL, Pieroni C, Nixon RA (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* 17:6142-6151
11. Cataldo AM, Mathews PM, Boiteau AB, Hassinger LC, Peterhoff CM, Jiang Y, Mullaney K, Neve RL, Gruenberg J, Nixon RA (2008) Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *Am J Pathol* 173:370-384. doi:10.2353/ajpath.2008.071053
12. Cataldo AM, Petanceska S, Peterhoff CM, Terio NB, Epstein CJ, Villar A, Carlson EJ, Staufienbiel M, Nixon RA (2003) App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of down syndrome. *J Neurosci* 23:6788-6792
13. Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, Mehta PD, Buxbaum J, Haroutunian V, Nixon RA (2004) Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging* 25:1263-1272. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.027
14. Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA (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

15. Choi JH, Kaur G, Mazzella MJ, Morales-Corraliza J, Levy E, Mathews PM (2013) Early endosomal abnormalities and cholinergic neuron degeneration in amyloid-beta protein precursor transgenic mice. *J Alzheimers Dis* 34:691-700. doi:10.3233/JAD-122143
16. Christoforidis S, Miaczynska M, Ashman K, Wilm M, Zhao L, Yip SC, Waterfield MD, Backer JM, Zerial M (1999) Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol* 1:249-252. doi:10.1038/12075
17. Colacurcio DJ, Nixon RA (2016) Disorders of lysosomal acidification-The emerging role of v-ATPase in aging and neurodegenerative disease. *Ageing Res Rev*. doi:10.1016/j.arr.2016.05.004
18. Cooper JD, Salehi A, Delcroix JD, Howe CL, Belichenko PV, Chua-Couzens J, Kilbridge JF, Carlson EJ, Epstein CJ, Mobley WC (2001) Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:10439-10444. doi:10.1073/pnas.181219298
19. Coppus AM, Schuur M, Vergeer J, Janssens AC, Oostra BA, Verbeek MM, van Duijn CM (2012) Plasma beta amyloid and the risk of Alzheimer's disease in Down syndrome. *Neurobiol Aging* 33:1988-1994. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2011.08.007
20. Corlier F, Rivals I, Lagarde J, Hamelin L, Corne H, Dauphinot L, Ando K, Cossec JC, Fontaine G, Dorothee G, Malaplate-Armand C, Olivier JL, Dubois B, Bottlaender M, Duyckaerts C, Sarazin M, Potier MC, Clinical ImaBio T (2015) Modifications of the endosomal compartment in peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Transl Psychiatry* 5:e595. doi:10.1038/tp.2015.87
21. Cossec JC, Lavaur J, Berman DE, Rivals I, Hoischen A, Stora S, Ripoll C, Mircher C, Grattau Y, Olivomarin JC, de Chaumont F, Lecourtois M, Antonarakis SE, Veltman JA, Delabar JM, Duyckaerts C, Di Paolo G, Potier MC (2012) Trisomy for synaptotagmin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. *Hum Mol Genet* 21:3156-3172. doi:10.1093/hmg/dds142
22. Cossec JC, Marquer C, Panchal M, Lazar AN, Duyckaerts C, Potier MC (2010) Cholesterol changes in Alzheimer's disease: methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes. *Biochim Biophys Acta* 1801:839-845. doi:10.1016/j.bbalip.2010.03.010
23. Currinn H, Guscott B, Balklava Z, Rothnie A, Wassmer T (2016) APP controls the formation of PI(3,5)P(2) vesicles through its binding of the PIKfyve complex. *Cell Mol Life Sci* 73:393-408. doi:10.1007/s00018-015-1993-0
24. de Chaumont F, Dallongeville S, Chenouard N, Herve N, Pop S, Provoost T, Meas-Yedid V, Pankajakshan P, Lecomte T, Le Montagner Y, Lagache T, Dufour A, Olivo-Marin JC (2012) Icy: an open bioimage informatics platform for extended reproducible research. *Nat Methods* 9:690-696. doi:10.1038/nmeth.2075
25. de Hoop MJ, Huber LA, Stenmark H, Williamson E, Zerial M, Parton RG, Dotti CG (1994) The involvement of the small GTP-binding protein Rab5a in neuronal endocytosis. *Neuron* 13:11-22
26. Delcroix JD, Valletta JS, Wu C, Hunt SJ, Kowal AS, Mobley WC (2003) NGF signaling in sensory neurons: evidence that early endosomes carry NGF retrograde signals. *Neuron* 39:69-84
27. Feldman H, Gabathuler R, Kennard M, Nurminen J, Levy D, Foti S, Foti D, Beattie BL, Jefferies WA (2001) Serum p97 levels as an aid to identifying Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 3:507-516
28. Gaullier JM, Simonsen A, D'Arrigo A, Bremnes B, Stenmark H, Aasland R (1998) FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature* 394:432-433. doi:10.1038/28767

29. Geula C, Nagykerly N, Nicholas A, Wu CK (2008) Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* 67:309-318. doi:10.1097/NEN.0b013e31816a1df3
30. Ginsberg SD, Mufson EJ, Alldred MJ, Counts SE, Wu J, Nixon RA, Che S (2011) Upregulation of select rab GTPases in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Chem Neuroanat* 42:102-110. doi:10.1016/j.jchemneu.2011.05.012
31. Ginsberg SD, Mufson EJ, Counts SE, Wu J, Alldred MJ, Nixon RA, Che S (2010) Regional selectivity of rab5 and rab7 protein upregulation in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 22:631-639. doi:10.3233/JAD-2010-101080
32. Grbovic OM, Mathews PM, Jiang Y, Schmidt SD, Dinakar R, Summers-Terio NB, Ceresa BP, Nixon RA, Cataldo AM (2003) Rab5-stimulated up-regulation of the endocytic pathway increases intracellular beta-cleaved amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragment levels and A β production. *J Biol Chem* 278:31261-31268. doi:10.1074/jbc.M304122200
33. Head E, Lott IT, Wilcock DM, Lemere CA (2016) Aging in Down Syndrome and the Development of Alzheimer's Disease Neuropathology. *Curr Alzheimer Res* 13:18-29
34. Heintzmann R, Cremer CG Laterally modulated excitation microscopy: improvement of resolution by using a diffraction grating. In, 1999. pp 185-196
35. Holtzman DM, Santucci D, Kilbridge J, Chua-Couzens J, Fontana DJ, Daniels SE, Johnson RM, Chen K, Sun Y, Carlson E, Alleva E, Epstein CJ, Mobley WC (1996) Developmental abnormalities and age-related neurodegeneration in a mouse model of Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:13333-13338
36. Hu YB, Dammer EB, Ren RJ, Wang G (2015) The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4:18. doi:10.1186/s40035-015-0041-1
37. Ikonov OC, Sbrissa D, Shisheva A (2001) Mammalian cell morphology and endocytic membrane homeostasis require enzymatically active phosphoinositide 5-kinase PIKfyve. *J Biol Chem* 276:26141-26147. doi:10.1074/jbc.M101722200
38. Ikonov OC, Sbrissa D, Shisheva A (2006) Localized PtdIns 3,5-P₂ synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *Am J Physiol Cell Physiol* 291:C393-404. doi:10.1152/ajpcell.00019.2006
39. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, Hefferan MP, Van Gorp S, Nazor KL, Boscolo FS, Carson CT, Laurent LC, Marsala M, Gage FH, Remes AM, Koo EH, Goldstein LS (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482:216-220. doi:10.1038/nature10821
40. Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, Boyer-Boiteau A, Ginsberg SD, Cataldo AM, Mathews PM, Nixon RA (2010) Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A β -independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:1630-1635. doi:10.1073/pnas.0908953107
41. Jiang Y, Rigoglioso A, Peterhoff CM, Pawlik M, Sato Y, Bleiwas C, Stavrides P, Smiley JF, Ginsberg SD, Mathews PM, Levy E, Nixon RA (2016) Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration: role of APP-CTF. *Neurobiol Aging* 39:90-98. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.013
42. Kelley CM, Powers BE, Velazquez R, Ash JA, Ginsberg SD, Strupp BJ, Mufson EJ (2014) Sex differences in the cholinergic basal forebrain in the Ts65Dn mouse model of Down syndrome and Alzheimer's disease. *Brain Pathol* 24:33-44. doi:10.1111/bpa.12073
43. Kennard ML, Feldman H, Yamada T, Jefferies WA (1996) Serum levels of the iron binding protein p97 are elevated in Alzheimer's disease. *Nat Med* 2:1230-1235

44. Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A, Rigoglioso A, Jiang Y, Nixon RA (2016) Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP-betaCTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 21:707-716. doi:10.1038/mp.2015.97
45. Koo EH, Squazzo SL (1994) Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269:17386-17389
46. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, Wolfe DM, Martinez-Vicente M, Massey AC, Sovak G, Uchiyama Y, Westaway D, Cuervo AM, Nixon RA (2010) Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141:1146-1158. doi:10.1016/j.cell.2010.05.008
47. Lehericy S, Hirsch EC, Cervera P, Hersch LB, Hauw JJ, Ruberg M, Agid Y (1989) Selective loss of cholinergic neurons in the ventral striatum of patients with Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:8580-8584
48. Mani M, Lee SY, Lucast L, Cremona O, Di Paolo G, De Camilli P, Ryan TA (2007) The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron* 56:1004-1018. doi:10.1016/j.neuron.2007.10.032
49. Mann DM, Esiri MM (1989) The pattern of acquisition of plaques and tangles in the brains of patients under 50 years of age with Down's syndrome. *J Neurol Sci* 89:169-179
50. Marquer C, Devauges V, Cossec JC, Liot G, Lecart S, Saudou F, Duyckaerts C, Leveque-Fort S, Potier MC (2011) Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J* 25:1295-1305. doi:10.1096/fj.10-168633
51. Marquer C, Laine J, Dauphinot L, Hanbouch L, Lemerrier-Neuillet C, Pierrot N, Bossers K, Le M, Corlier F, Benstaali C, Saudou F, Thinakaran G, Cartier N, Octave JN, Duyckaerts C, Potier MC (2014) Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Mol Neurodegener* 9:60. doi:10.1186/1750-1326-9-60
52. Mindell JA (2012) Lysosomal acidification mechanisms. *Annu Rev Physiol* 74:69-86. doi:10.1146/annurev-physiol-012110-142317
53. Morel E, Chamoun Z, Lasiecka ZM, Chan RB, Williamson RL, Vetanovetz C, Dall'Armi C, Simoes S, Point Du Jour KS, McCabe BD, Small SA, Di Paolo G (2013) Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nat Commun* 4:2250. doi:10.1038/ncomms3250
54. Murray A, Letourneau A, Canzonetta C, Stathaki E, Gimelli S, Sloan-Bena F, Abrehart R, Goh P, Lim S, Baldo C, Dagna-Bricarelli F, Hannan S, Mortensen M, Ballard D, Syndercombe Court D, Fusaki N, Hasegawa M, Smart TG, Bishop C, Antonarakis SE, Groet J, Nizetic D (2015) Brief report: isogenic induced pluripotent stem cell lines from an adult with mosaic down syndrome model accelerated neuronal ageing and neurodegeneration. *Stem Cells* 33:2077-2084. doi:10.1002/stem.1968
55. Neefjes J, van der Kant R (2014) Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 37:66-76. doi:10.1016/j.tins.2013.11.006
56. Nielsen E, Christoforidis S, Uttenweiler-Joseph S, Miaczynska M, Dewitte F, Wilm M, Hoflack B, Zerial M (2000) Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol* 151:601-612
57. Pillay CS, Elliott E, Dennison C (2002) Endolysosomal proteolysis and its regulation. *Biochem J* 363:417-429
58. Portelius E, Soininen H, Andreasson U, Zetterberg H, Persson R, Karlsson G, Blennow K, Herukka SK, Mattsson N (2014) Exploring Alzheimer molecular pathology in Down's syndrome cerebrospinal fluid. *Neurodegener Dis* 14:98-106. doi:10.1159/000358800

59. Poteryaev D, Datta S, Ackema K, Zerial M, Spang A (2010) Identification of the switch in early-to-late endosome transition. *Cell* 141:497-508. doi:10.1016/j.cell.2010.03.011
60. Pryor PR, Mullock BM, Bright NA, Gray SR, Luzio JP (2000) The role of intraorganellar Ca(2+) in late endosome-lysosome heterotypic fusion and in the reformation of lysosomes from hybrid organelles. *J Cell Biol* 149:1053-1062
61. Ramanathan HN, Ye Y (2012) The p97 ATPase associates with EEA1 to regulate the size of early endosomes. *Cell Res* 22:346-359. doi:10.1038/cr.2011.80
62. Reeves RH, Irving NG, Moran TH, Wohn A, Kitt C, Sisodia SS, Schmidt C, Bronson RT, Davisson MT (1995) A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet* 11:177-184. doi:10.1038/ng1095-177
63. Roberts RL, Barbieri MA, Pryse KM, Chua M, Morisaki JH, Stahl PD (1999) Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J Cell Sci* 112 (Pt 21):3667-3675
64. Sabbagh MN, Chen K, Rogers J, Fleisher AS, Liebsack C, Bandy D, Belden C, Protas H, Thiyyagura P, Liu X, Roontiva A, Luo J, Jacobson S, Malek-Ahmadi M, Powell J, Reiman EM (2015) Florbetapir PET, FDG PET, and MRI in Down syndrome individuals with and without Alzheimer's dementia. *Alzheimers Dement* 11:994-1004. doi:10.1016/j.jalz.2015.01.006
65. Salehi A, Delcroix JD, Belichenko PV, Zhan K, Wu C, Valletta JS, Takimoto-Kimura R, Kleschevnikov AM, Sambamurti K, Chung PP, Xia W, Villar A, Campbell WA, Kulnane LS, Nixon RA, Lamb BT, Epstein CJ, Stokin GB, Goldstein LS, Mobley WC (2006) Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron* 51:29-42. doi:10.1016/j.neuron.2006.05.022
66. Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel D, George-Hyslop PH, Pericak-Vance MA, Joo SH, Rosi BL, Gusella JF, Crapper-MacLachlan DR, Alberts MJ, et al. (1993) Association of apolipoprotein E allele epsilon 4 with late-onset familial and sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 43:1467-1472
67. Sbrissa D, Ikononov OC, Fu Z, Ijuin T, Gruenberg J, Takenawa T, Shisheva A (2007) Core protein machinery for mammalian phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate synthesis and turnover that regulates the progression of endosomal transport. Novel Sac phosphatase joins the ArPIKfyve-PIKfyve complex. *J Biol Chem* 282:23878-23891. doi:10.1074/jbc.M611678200
68. Seo H, Isacson O (2005) Abnormal APP, cholinergic and cognitive function in Ts65Dn Down's model mice. *Exp Neurol* 193:469-480. doi:10.1016/j.expneurol.2004.11.017
69. Shao L, Kner P, Rego EH, Gustafsson MG (2011) Super-resolution 3D microscopy of live whole cells using structured illumination. *Nat Methods* 8:1044-1046. doi:10.1038/nmeth.1734
70. Sheehan R, Sinai A, Bass N, Blatchford P, Bohnen I, Bonell S, Courtenay K, Hassiotis A, Markar T, McCarthy J, Mukherji K, Naeem A, Paschos D, Perez-Achiaga N, Sharma V, Thomas D, Walker Z, Strydom A (2015) Dementia diagnostic criteria in Down syndrome. *Int J Geriatr Psychiatry* 30:857-863. doi:10.1002/gps.4228
71. Simonsen A, Lippe R, Christoforidis S, Gaullier JM, Brech A, Callaghan J, Toh BH, Murphy C, Zerial M, Stenmark H (1998) EEA1 links PI(3)K function to Rab5 regulation of endosome fusion. *Nature* 394:494-498. doi:10.1038/28879
72. Stenmark H, Aasland R, Toh BH, D'Arrigo A (1996) Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem* 271:24048-24054
73. Stenmark H, Parton RG, Steele-Mortimer O, Lutcke A, Gruenberg J, Zerial M (1994) Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *EMBO J* 13:1287-1296

74. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:1977-1981
75. Sturgeon X, Gardiner KJ (2011) Transcript catalogs of human chromosome 21 and orthologous chimpanzee and mouse regions. *Mamm Genome* 22:261-271. doi:10.1007/s00335-011-9321-y
76. Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* 283:29615-29619. doi:10.1074/jbc.R800019200
77. Tjelle TE, Brech A, Juvet LK, Griffiths G, Berg T (1996) Isolation and characterization of early endosomes, late endosomes and terminal lysosomes: their role in protein degradation. *J Cell Sci* 109 (Pt 12):2905-2914
78. Tlili A, Hoischen A, Ripoll C, Benabou E, Badel A, Ronan A, Touraine R, Grattau Y, Stora S, van Bon B, de Vries B, Menten B, Bockaert N, Gecz J, Antonarakis SE, Campion D, Potier MC, Blehaut H, Delabar JM, Janel N (2012) BDNF and DYRK1A are variable and inversely correlated in lymphoblastoid cell lines from Down syndrome patients. *Mol Neurobiol* 46:297-303. doi:10.1007/s12035-012-8284-7
79. Voronov SV, Frere SG, Giovedi S, Pollina EA, Borel C, Zhang H, Schmidt C, Akeson EC, Wenk MR, Cimasoni L, Arancio O, Davisson MT, Antonarakis SE, Gardiner K, De Camilli P, Di Paolo G (2008) Synaptojanin 1-linked phosphoinositide dyshomeostasis and cognitive deficits in mouse models of Down's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:9415-9420. doi:10.1073/pnas.0803756105
80. Waugh MG (2015) PIPs in neurological diseases. *Biochim Biophys Acta* 1851:1066-1082. doi:10.1016/j.bbalip.2015.02.002
81. Wegner CS, Malerod L, Pedersen NM, Progida C, Bakke O, Stenmark H, Brech A (2010) Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5. *Histochem Cell Biol* 133:41-55. doi:10.1007/s00418-009-0643-8
82. Wilson JM, de Hoop M, Zorzi N, Toh BH, Dotti CG, Parton RG (2000) EEA1, a tethering protein of the early sorting endosome, shows a polarized distribution in hippocampal neurons, epithelial cells, and fibroblasts. *Mol Biol Cell* 11:2657-2671
83. Wiseman FK, Al-Janabi T, Hardy J, Karmiloff-Smith A, Nizetic D, Tybulewicz VL, Fisher EM, Strydom A (2015) A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci* 16:564-574. doi:10.1038/nrn3983
84. Xu W, Weissmiller AM, White JA, Fang F, Wang X, Wu Y, Pearn ML, Zhao X, Sawa M, Chen S, Gunawardena S, Ding J, Mobley WC, Wu C (2016) Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration. *Journal of Clinical Investigation* 126:1815-1833. doi:10.1172/jci82409
85. Zhu L, Zhong M, Zhao J, Rhee H, Caesar I, Knight EM, Volpicelli-Daley L, Bustos V, Netzer W, Liu L, Lucast L, Ehrlich ME, Robakis NK, Gandy SE, Cai D (2013) Reduction of synaptojanin 1 accelerates Abeta clearance and attenuates cognitive deterioration in an Alzheimer mouse model. *J Biol Chem* 288:32050-32063. doi:10.1074/jbc.M113.504365

Figure 1

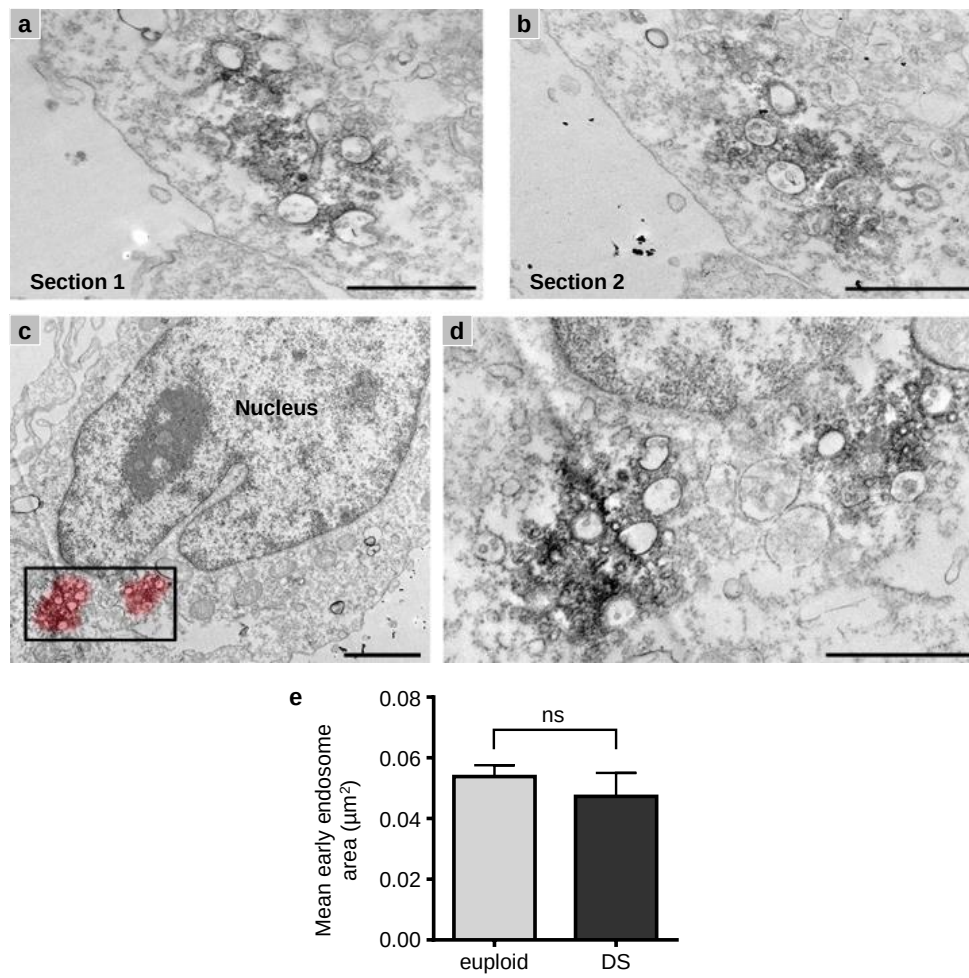


Figure 2

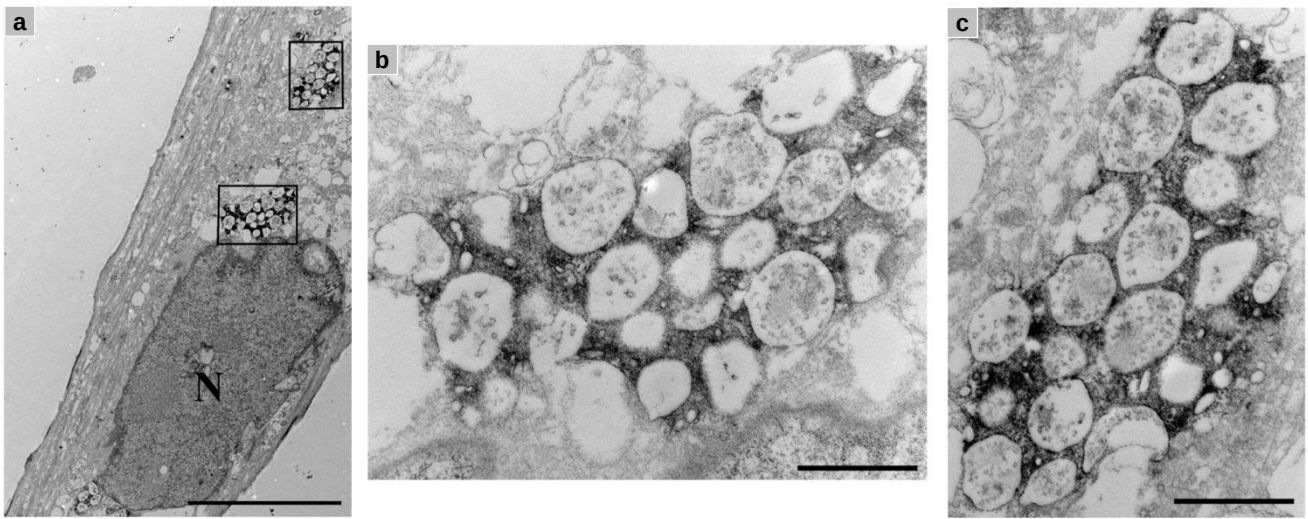


Figure 3

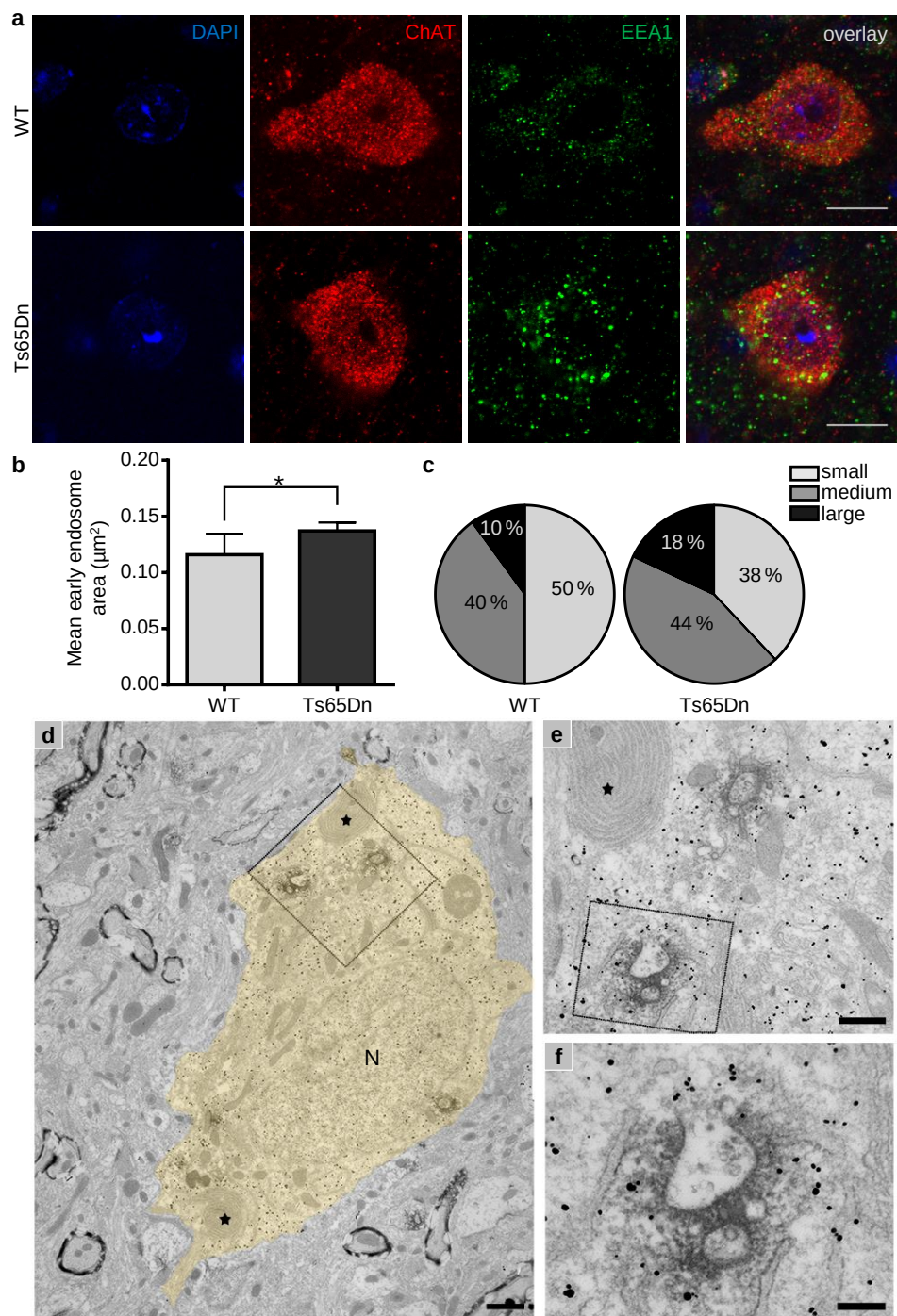


Figure 4

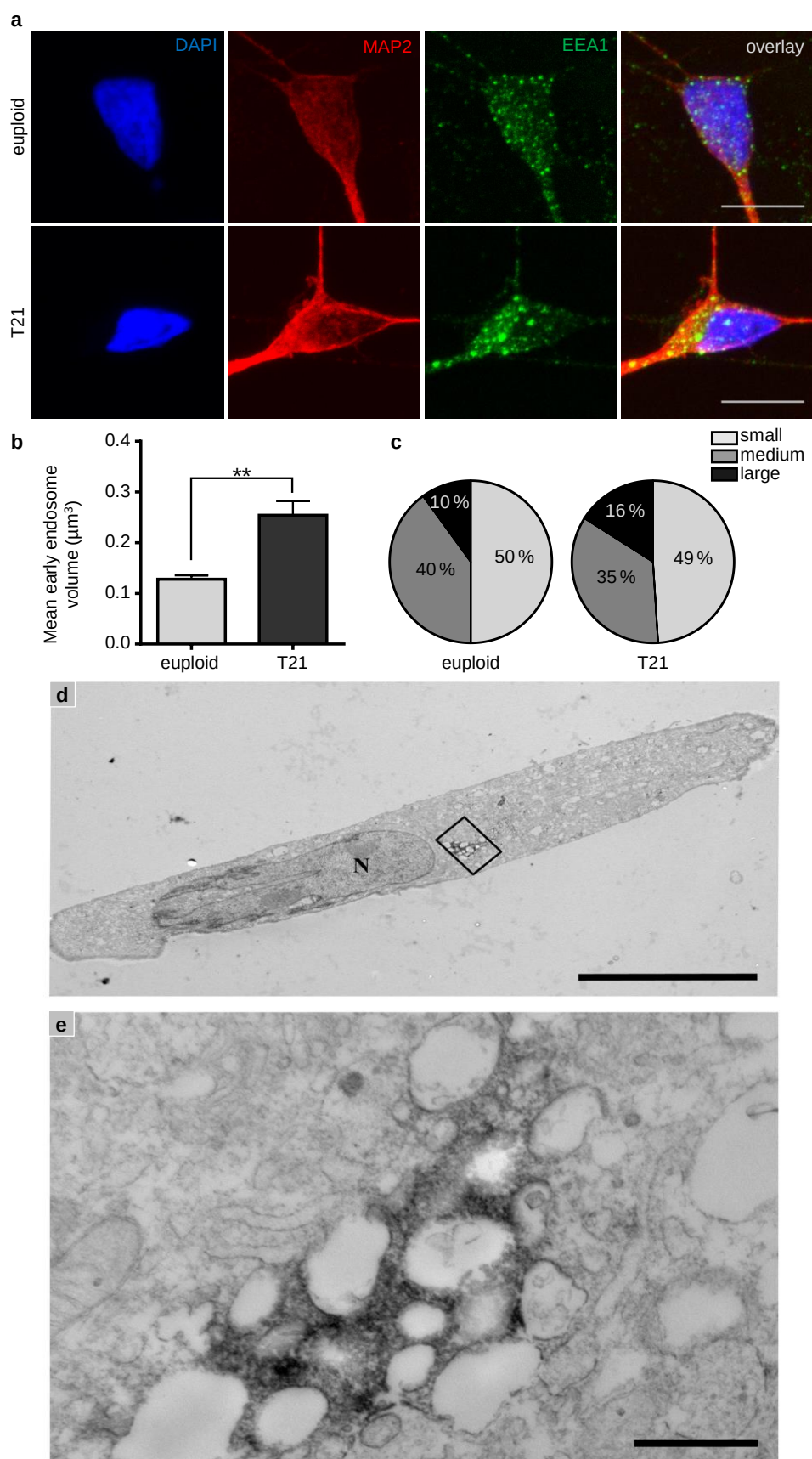
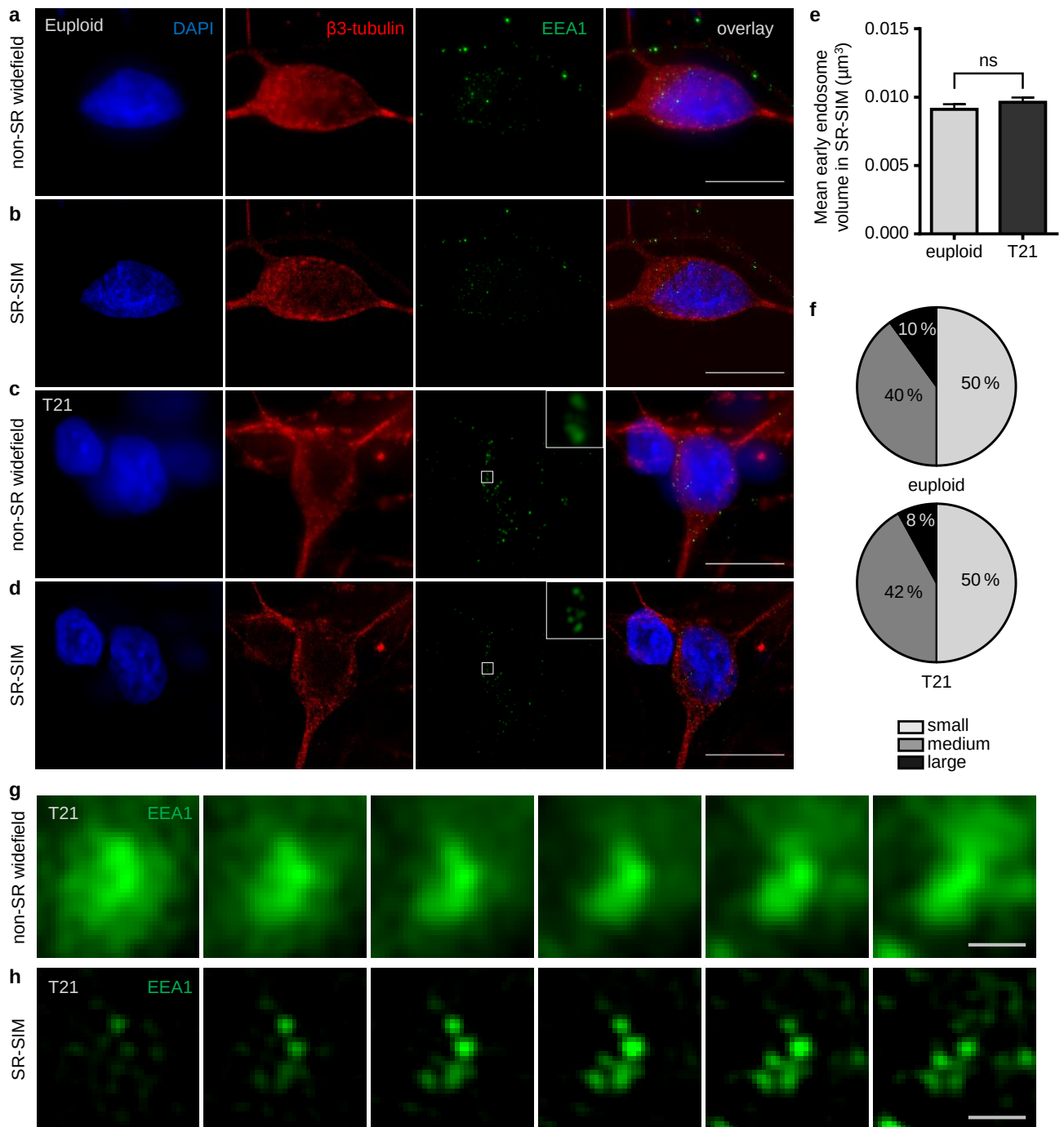
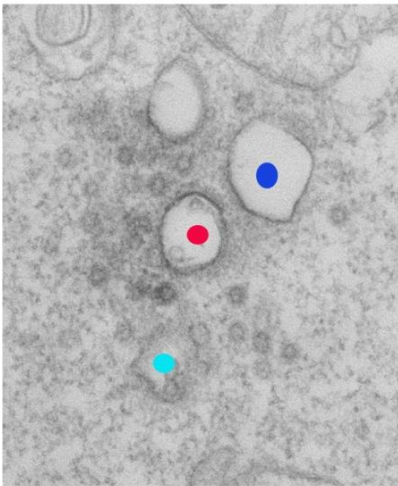


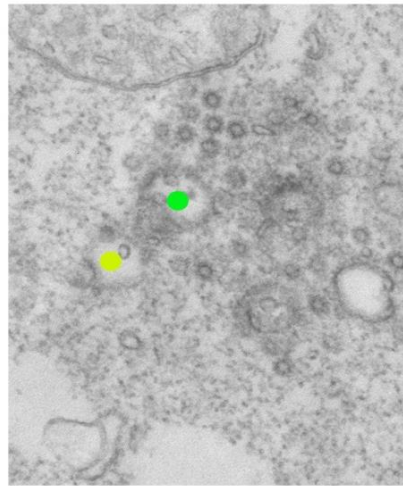
Figure 5



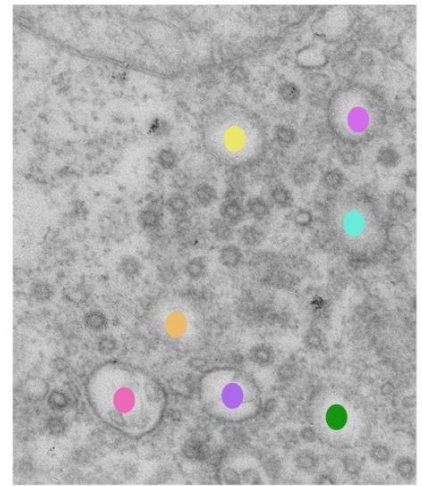
Suppl. Figure 1



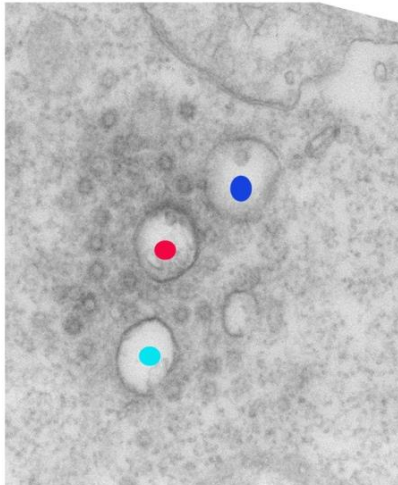
Section 1



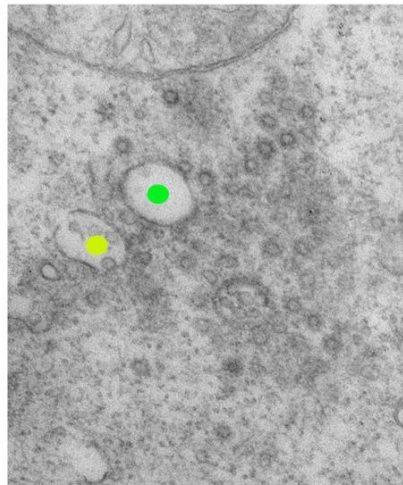
Section 4



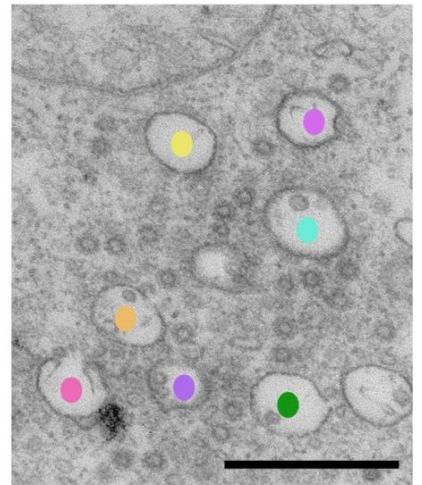
Section 7



Section 2



Section 5

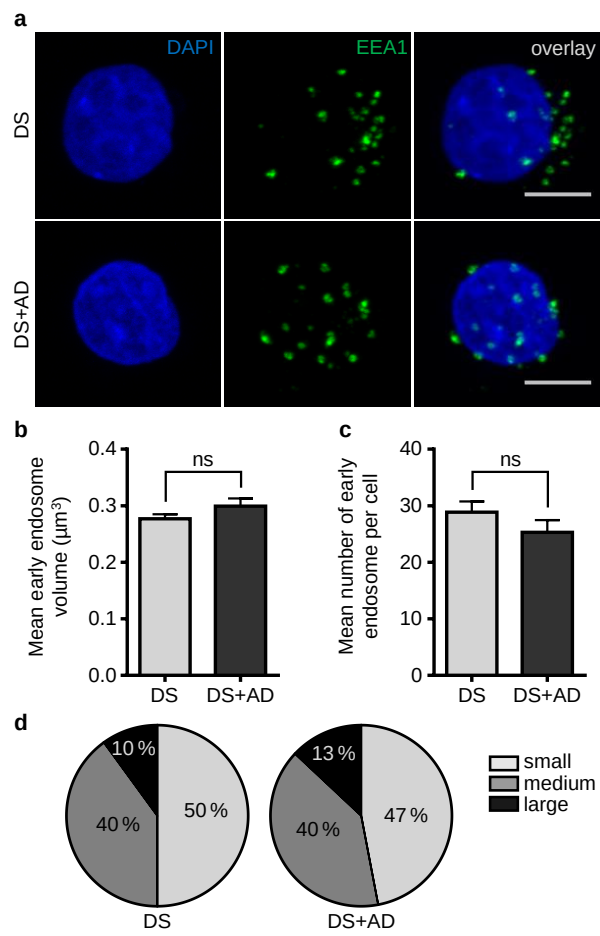


Section 8

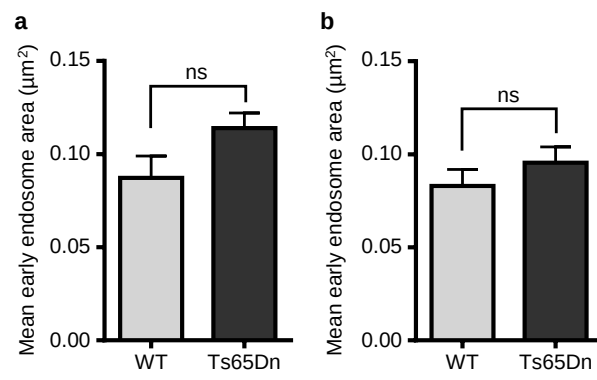
Suppl. Table 1

Line ID	Disease	Karyotype	Age	Gender	APOE genotype
2166.1.1	DS	3N	62	F	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
4221.2.1	DS	3N	44	F	$\epsilon 3 / \epsilon 4$
12453.4.2	DS	3N	44.5	M	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
13585.4.3	DS	3N	44	M	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
13705.5.3	DS	3N	59	M	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
13817.5.3	DS	3N	45	M	$\epsilon 2 / \epsilon 3$
14609.5.2	DS	3N	48	M	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
12260.1.3	DS+AD	3N	67	M	$\epsilon 2 / \epsilon 3$
12339.2.3	DS+AD	3N	42	F	$\epsilon 3 / \epsilon 4$
11258.2.3	DS+AD	3N	57	F	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
11840.2.3	DS+AD	3N	56	F	$\epsilon 2 / \epsilon 4$
13650.5.3	DS+AD	3N	58	M	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
13840.5.3	DS+AD	3N	66	F	$\epsilon 3 / \epsilon 3$
14020.5.3	DS+AD	3N	52	F	$\epsilon 3 / \epsilon 3$

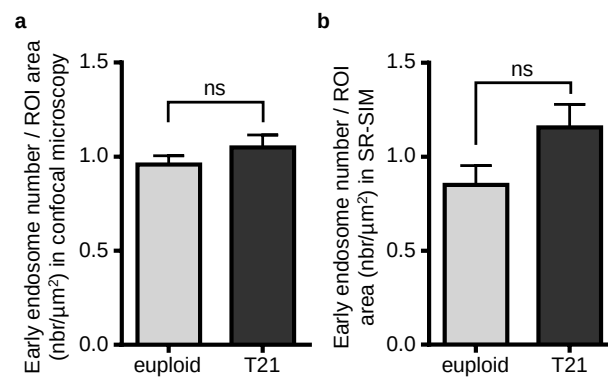
Suppl. Figure 2



Suppl. Figure 3



Suppl. Figure 4



Annexe 2

Revue soumise à Elsevier pour l'ouvrage PBR: Preclinical Research in Down syndrome:
From Bench to Bedside Volume 250.

The endo-lysosomal pathway in Down syndrome

Running title: The endo-lysosomal pathway in Down syndrome.

Title: Manuscript 9: Focusing on cellular biomarkers: the endo-lysosomal pathway in Down syndrome

Authors : Alexandra Botté and Marie-Claude Potier*

Affiliation :

Institut du Cerveau et de la Moelle épinière (ICM)
CNRS UMR7225, INSERM U1127, Sorbonne Université
Hôpital de la Pitié-Salpêtrière
Paris, France

*Corresponding author marie-claude.potier@upmc.fr

Acknowledgements:

AB PhD fellowship was funded by “Vaincre Alzheimer”. The research leading to these results has received funding from the program “Investissements d’avenir” (ANR-10-IAIHU-06).

Abstract

Down syndrome (DS) is the most frequent chromosomal disorder. It is caused by the triplication of human chromosome 21, leading to increased dosage of a variety of genes including *APP* (Amyloid Precursor Protein). Mainly for this reason, individuals with DS are at high risk to develop Alzheimer's disease (AD). Extensive literature identified various morphological and molecular abnormalities in the endo-lysosomal pathway both in DS and AD. Most studies in this field investigated the causative role of APP (Amyloid Precursor Protein) in endo-lysosomal dysfunctions, thus linking phenotypes observed in DS and AD. In DS context, several lines of evidence and emerging hypotheses suggest that other molecular players and pathways may be implicated in these complex phenotypes. In this review, we outline the normal functioning of endosomal trafficking and summarize the research on endo-lysosomal dysfunction in DS in light of AD findings. We emphasize the role of genes of chromosome 21 implicated in endocytosis to explain endosomal abnormalities and set the limitations and perspectives of models used to explore endo-lysosomal dysfunction in DS and find new biomarkers. The review highlights the complexity of endo-lysosomal dysfunction in DS and suggests directions for future research in the field.

Keywords: Down syndrome, Alzheimer's disease, endosomes, endo-lysosomal system, biomarkers

Introduction

Down syndrome (DS) is the most common genetic condition leading to intellectual disability. This disorder results from an extra copy of chromosome 21 (HSA21) (Lejeune et al., 1959). Later in life, individuals with DS have a higher risk to develop Alzheimer's disease (AD) than the general population (Lott and Head, 2019, Wiseman et al., 2015). AD is a neurodegenerative disease arising sporadically or from genetic origin. The genetic forms of AD are caused by mutations in the genes encoding APP (Amyloid Precursor Protein), PSEN1 or PSEN2 (Presenilin 1 & 2) (Carmona et al., 2018). AD is characterized by extracellular deposits of A β peptides and intracellular neurofibrillary tangles made of hyperphosphorylated tau protein (Duyckaerts et al., 2009). Since the *APP* gene maps to HSA21, AD development in DS primarily focused on the effect of APP overexpression and altered processing. However, several studies showed the involvement of other genes from HSA21 in the etiology of AD in DS (Cossec et al., 2012, Wiseman et al., 2018).

Endosomal enlargement or swelling was identified as the earliest morphological neuropathological change occurring in AD and DS brains (Cataldo et al., 2000). AD pathogenesis is closely linked to the endo-lysosomal pathway, as amyloidogenic processing of APP mostly occurs in endosomes (Kinoshita et al., 2003, Koo and Squazzo, 1994). More recently, GWAS (Genome Wide Association Studies) identified polymorphisms associated with increased risk of AD development in genes encoding proteins that are direct regulators of the endo-lysosomal pathway: PICALM, BIN1, SORL1 and CD2AP (Karch and Goate, 2015). For instance PICALM, phosphatidylinositol clathrin binding assembly protein, regulates the initial steps of clathrin-mediated endocytosis (CME) by recruiting the adaptor AP-2 and clathrin at clathrin-coated pits. PICALM undergoes abnormal cleavage and is associated with hyperphosphorylated Tau in AD, DS brains and other neurodegenerative diseases (Ando et al., 2013, Ando et al., 2016).

Other risk factors for AD are indirectly linked to endosomal regulation. The major risk factor for sporadic AD is the *APOE ϵ 4* allele (Corder et al., 1993). APOE is a cholesterol transporter in the brain. Several lines of evidence link APOE4 and cholesterol to endosomal abnormalities in AD and DS (Cataldo et al., 2000, Cataldo et al., 2001). Additionally, increasing cholesterol at the plasma membrane leads to early endosome enlargement, altered APP endocytosis and processing, and increased A β secretion (Cossec et al., 2010a, Cossec et al., 2010b, Marquer et al., 2011, Marquer et al., 2014).

Recent reviews highlight the link between APP and endo-lysosomal dysfunction in AD (Nixon, 2017) and the role of autophagy and lysosomal disruption in AD and DS (Colacurcio et al., 2018). Here, we will focus on endosomal function and dysfunction in DS, taking into account findings in AD. We will discuss the relevance of cellular or biochemical biomarkers linked to endosomal changes in DS and AD. We will outline the implication of genes overexpressed in DS other than *APP* in these phenotypes and consider possible abnormalities in phosphoinositides homeostasis. Finally we will review models used so far to characterize endosomes in DS and suggest future directions to overcome the limit of past studies considering new technological advances in DS models and cellular exploration.

The healthy endo-lysosomal pathway

Early endosomes

Endocytic vesicles produced by all types of endocytosis converge toward early endosomes (also named sorting endosomes). This population of intracellular organelles is specialized in cargo sorting coming from the plasma membrane and the secretion pathway, as well as signaling. In electron microscopy, early endosomes morphology is usually characterized by a vacuolar element from which tubules emanate (Klumperman and Raposo, 2014). The vacuolar part is associated to maturation in the degradation pathway toward lysosomes, and tubules are the site of cargo sorting to plasma membrane recycling (directly or via the ERC, Endocytic Recycling Compartment) or retrograde transport to the TGN (Trans-Golgi Network) and ER (Endoplasmic Reticulum) via the retromer complex. Early endosomes are highly dynamic organelles, constantly undergoing fusion with other compartments (heterotypic fusion) or other early endosomes (homotypic fusion) as well as fission, allowing proper cargo targeting. Early endosomes size and kinetic highly varies according to cell types, but their diameter measured by electron microscopy generally ranges between 100 nm and 500 nm (Klumperman and Raposo, 2014).

The different compartments of the endosomal pathway are distinguished by specific markers. Early endosomes can be identified with the Rab-GTPase Rab5 and its effectors (e.g. Early Endosome Antigen 1 EEA1, Rabenosyn-5), recycling endosomes carry Rab4 and Rab11, late endosomes switch Rab5 for Rab7 during maturation. Numerous electron microscopy studies used fluid phase markers (Horse Radish Peroxidase, HRP or Bovine Serum Albumine-gold),

ligands of endocytosed receptor or receptor staining to study endocytosis dynamic. These markers reach the early endosome compartment within 3 minutes at 37°C (Kleijmeer et al., 1997), the recycling endosomes approximately 5 minutes later (Tooze and Hollinshead, 1991) and degradation compartments (late endosomes and lysosomes) after a total of 10 minutes.

All intracellular organelles are regulated by specific Rab-GTPase activity (Stenmark, 2009). Localized at the plasma membrane and early endosomes (Chavrier et al., 1990), Rab5 is a major regulator of early endosome fusion (Bucci et al., 1992) and endo-lysosomal compartment biogenesis and maintenance (Zeigerer et al., 2012). Inactive GDP-bound Rab5 is stabilized by a Rab-GDI (GDP Dissociation Inhibitor), allowing Rab5 solubility in the cytosol (Ullrich et al., 1993). Active GTP-bound Rab5 is recruited to early endosome membrane by GEF (Guanine-nucleotide Exchange Factor) Rabex-5 associated to Rabaptin-5 (Horiuchi et al., 1997, Lippe et al., 2001, Stenmark et al., 1995). Rabex-5-Rabaptin-5 complex recruitment is promoted in a positive feedback loop, greatly increasing Rab5-GTP association with the early endosome limiting membrane. Understanding Rab5 role in endocytosis was greatly enabled by the study of Rab5 mutants Rab5-Q79L (constitutively active, GTP-bound) and Rab5-S64N constitutively inactive, GDP-bound). Rab5-Q79L overexpression causes early endosome swelling by increasing fusion, along with increased transferrin receptor endocytosis and decreased recycling (Roberts et al., 1999, Stenmark et al., 1994, Wegner et al., 2010). Conversely, expression of Rab5-S64N induces accumulation of small-sized early endosomes (~ 100 nm) in the cell (Stenmark et al., 1994). Rab5 is also involved in uncoating of clathrin-coated vesicles (Semerdjieva et al., 2008).

Active Rab5 mediates early endosome fusion through recruitment of effectors. Rab5-GTP promotes local production of PI(3)P by activation of a phosphoinositide-3-OH kinase, PI 3-K class III Vps34 (Vacuolar Protein Sorting 34) (Li et al., 1995, Christoforidis et al., 1999) (Figure 1). PI(3)P in turn recruits a variety of effectors implicated in fusion such as EEA1 and Rabenosyn-5 (Burd and Emr, 1998, Gaullier et al., 1998, Nielsen et al., 2000, Patki et al., 1998, Stenmark et al., 1996) and sorting factors such as SNX (Sorting NeXins) and the ESCRT (Endosomal Sorting Complexes Required for Transport) machinery members (Burda et al., 2002, Cozier et al., 2002, Raiborg et al., 2001). Significant effectors are tethering factors, enabling endosomes to get closer before fusion operated by the SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor) machinery. These tether include coiled-coil proteins (e.g. EEA1, Rabenosyn-5) and multiprotein complexes (e.g. CORVET,

class C core Vacuole/Endosome Tethering) (Gautreau et al., 2014). Thus, Rab5 activation is locally associated to PI(3)P production and effectors recruitment, creating functional microdomains at the limiting membrane of early endosomes.

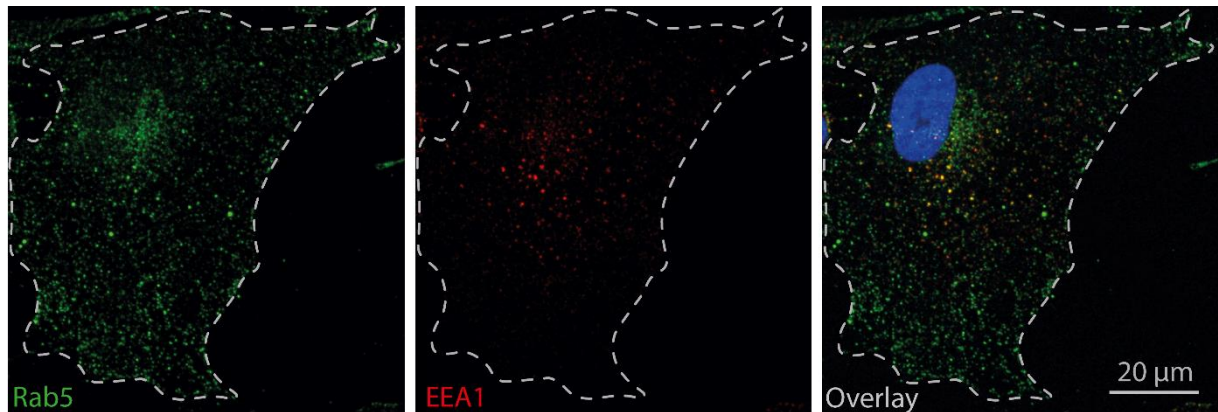


Figure 1. Example of early endosome subpopulations. Immunostaining of Rab5 and EEA1 (nucleus stained with DAPI) in a fibroblast from a control individual, showing that Rab5 and EEA1 are partially colocalized. Rab5-positive early endosomes are more peripherally located than EEA1-positive early endosomes, more located to the perinuclear region.

The successive gain of effectors outlines subpopulations of early endosomes, and distinguishes between maturation steps and location, as maturing endosomes are usually transported from the cell periphery to the peri-nuclear region. This is evidenced by Rab5 activation-dependent distribution of early endosomes in the cytoplasm (Stenmark et al., 1994). Accordingly, Rab5 and EEA1 only partially co-localize and Rab5-positive endosomes are more peripherally located than EEA1 endosomes (Figure 2). Coexistence of microdomains of different Rab at the surface of early endosomes allows functional compartmentalization of endosomal membrane (Sonnichsen et al., 2000). Another example of endosomal variety are APPL1 (adaptor protein, phosphotyrosine interacting with PH domain and leucine zipper 1)-positive endosomes. Among Rab5 effectors, APPL1 was identified as a signaling effector localized on a subpopulation of early endosomes (EEA1-negative) (Miaczynska et al., 2004). Initially described as an intermediate endosomal compartment upstream to EEA1-positive endosomes (Zoncu et al., 2009), APPL1 endosomes were recently identified as an independent endosomal compartment (Kalaidzidis et al., 2015). Thus, the marker used to identify early endosomes may reflect a given population and/or maturation stage. These aspects are important to consider when describing

early endosomes characteristics as they may differ with marker and not be representative of the general early endosome population.

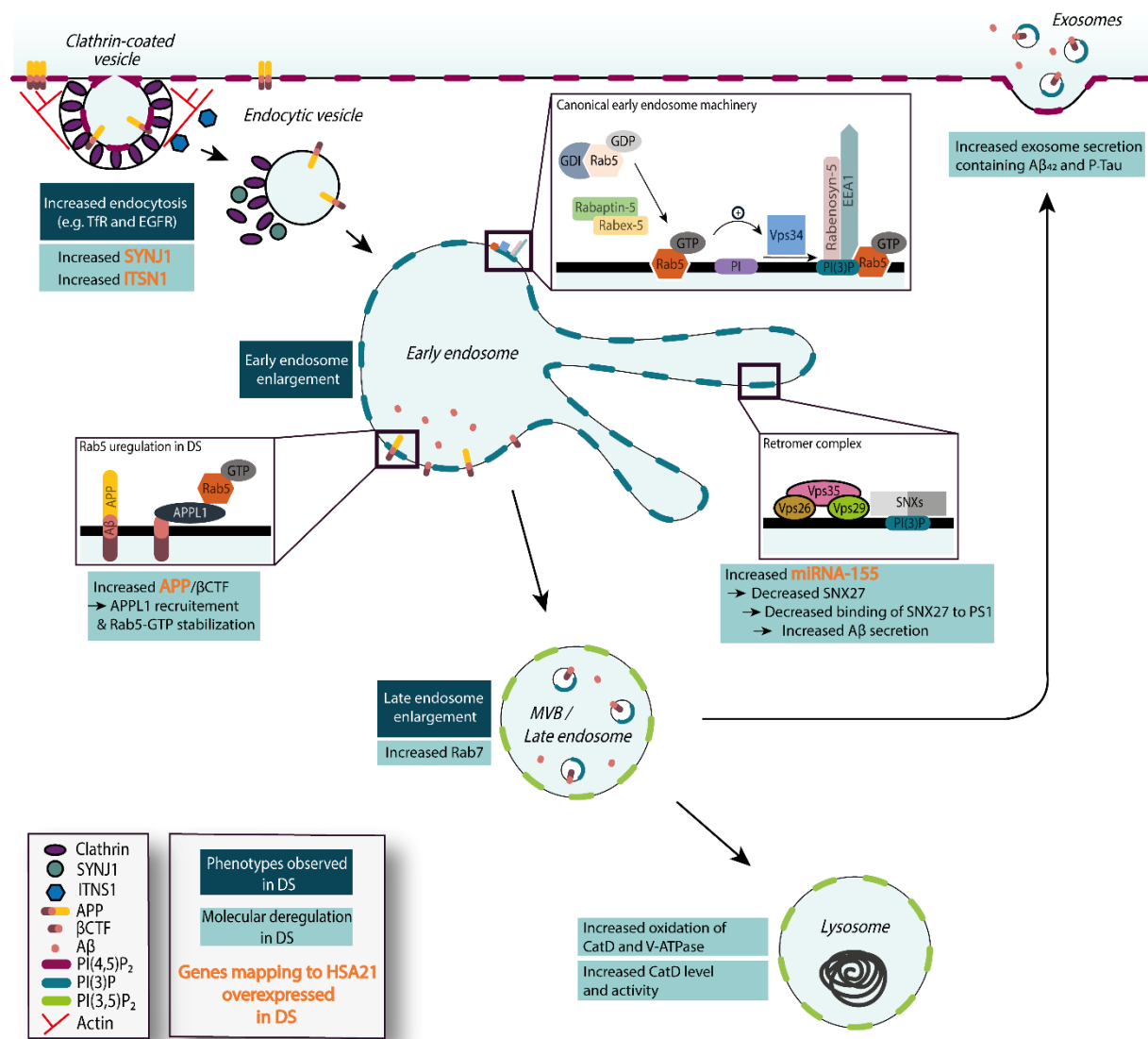


Figure 2. Abnormal phenotypes and molecular dysfunctions of the endosomal pathway in DS.

Late endosome & lysosome

Ubiquitinated cargos are targeted to the endosomal maturation pathway leading to late endosomes and eventually lysosomes to be degraded (Figure 1). Early endosome maturation in late endosome is marked by the Rab5-Rab7 switch (Rink et al., 2005). In turn, Rab7 recruits effectors such as the HOPS (homotypic fusion and vacuole protein sorting) tethering complex and the retromer complex (Liu et al., 2012, Rojas et al., 2008, Seals et al., 2000). The Rab switch is associated to ILV (intraluminal vesicles) formation under the control of the ESCRT

machinery, forming MVB (multivesicular bodies). ESCRT-0, -I, -II, -III successively sequester ubiquitinated cargos at endosomal surface, invaginate the limiting membrane of endosomes and mediate fission between ILV and endosomal membrane (Bache et al., 2003a, Bache et al., 2003b, Wollert et al., 2009, Wollert and Hurley, 2010). ILV emerging from the limiting membrane of endosomes are enriched in PI(3)P (Gillooly et al., 2000). ILV present in late endosomes are rather enriched in LBPA (LysoBisPhosphatidic Acid), a lipid specifically found in this compartment (Kobayashi et al., 1998, Kobayashi et al., 2002). The PI(3)P pool located at the limiting membrane of early endosomes is substituted for PI(3,5)P₂ by the 5-kinase PIKfyve (Phosphoinositide Kinase, FYVE-Type Zinc Finger Containing) (Ikonomov et al., 2006, McCartney et al., 2014, Sbrissa et al., 2002). PIKfyve inhibition induces vacuolation, defective EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor) degradation and default in pH acidification (de Lartigue et al., 2009, Jefferies et al., 2008). Indeed, endosomal maturation is marked by gradual pH acidification (Galloway et al., 1983). The acidification process lowers the endosomal intraluminal pH from ~ 6,5 in early endosome to ~ 4,5 in lysosomes. It is mediated by vacuolar proton pumps, V-ATPase (Galloway et al., 1983). Acidic pH is necessary for ligand-receptor dissociation, acid hydrolases activity and regulation of endosomal traffic and maturation.

MVB can also be targeted to the plasma membrane. Fusion of MVB with the plasma membrane results in ILV release in the extracellular space, thus becoming exosomes (Figure 1). Exosomes can interact with distant target cells in the organism. Exosome engineering is a promising tool for treatment development in a variety of diseases (Colombo et al., 2014).

Retromer

Recycling of cargos to the plasma membrane or retrograde transport to the TGN is mediated by the retromer complex. The retromer complex is formed by different functional modules typically assembling on the tubular part of the endosomal membrane. The retromer cargo-recognition core (CRC) is composed of the trimer Vps26-Vps29-Vps35. The heterodimer of SNX is responsible for endosomal membrane targeting of the complex by binding of their PX (phox) domain to endosomal PI(3)P (Burda et al., 2002, Cozier et al., 2002). Some SNX carry additional domains involved in specific functions such as cargo recognition or membrane tubulation mediated by the BAR (Bin1/Amphiphysin/Rvs) domain (Wang et al., 2018). Additionally, a number of other proteins assemble and cooperate with the core complex to

mediate retromer function. For instance, the WASH (Wiskott Aldrich Syndrome protein and scar homologue) complex recruited by Vps35 is involved in membrane tubulation by promoting actin polymerization at the endosomal membrane (Harbour et al., 2010).

Endo-lysosomal dysfunctions in DS and AD

Early endosomes

Enlarged early endosomes were first described by the group of R. Nixon when analyzing *post-mortem* human brain samples from late onset AD patients (Cataldo et al., 1997). Using immunohistochemistry on 30-40µm-thick vibratome sections from formalin fixed tissue with a very short *post-mortem* delay (usually less than 6 hours) and a short fixation time (usually less than 2 weeks), they found endosomal alterations corresponding to increased endocytic activity in pyramidal neurons, detectable at early stages of the disease and absent in other neurodegenerative diseases such as Huntington, Pick, Lewy body diseases, progressive supranuclear palsy, amyotrophic lateral sclerosis or encephalitis. This lab further showed increased levels of markers of internalization (Rab5 and rabaptin) and recycling (Rab4) before Aβ deposition (Cataldo et al., 2000). Rab5 immunoreactivity was described associated to intracellular Aβ immunoreactivity, prominently in enlarged endosomes (Cataldo et al., 2004). The *APOEε4* carriers presented even larger endosomal compartment. Additionally, they identified similar changes in the early endosomal compartment in DS, even during gestation (Cataldo et al., 2000). In familial AD (FAD), endosomal alterations were dependent on mutations. While mutations in the presenilin genes (PSEN1 and PSEN2) presented no alteration of the early endosomal compartment, several cases with APP mutations produced endosomal changes: the London and Flemish mutations, whatever their *APOEε4* genotype. However, in cases with the Swedish mutation only the *APOEε4* positive had enlarged endosomes and in cases with the Dutch mutation, enlarged endosomes were found in endothelial cells but not in neurons (Cataldo et al., 2001). Table 1 gives an overview of the endosomal phenotype in various forms of AD.

Familial Alzheimer Disease	Enlarged endosomes in neurons	Enlarged endosomes in endothelial cells
<i>APP Swedish/APOE4</i>	YES	YES
<i>APP London</i>	YES	YES
<i>APP Dutch</i>	YES	NO

<i>APP Flemish</i>	YES	YES
<i>PSEN1</i>	NO	NO
<i>PSEN2</i>	NO	NO

Table 1. Enlarged endosome phenotype in neurons and endothelial cells in Familial Alzheimer's disease.

In DS since all cells carry three copies of HSA21, one could suspect some common phenotypes between neuronal cells and peripheral cells. Indeed, endosomal modifications were detected in fibroblasts from individuals with DS. Enlarged size of Rab5-, EEA1-, Rab4- and Rab7-positive early and late endosomes was accompanied with higher levels of Rab4, Rab5 and Rab7. Increased internalization of several receptors such as the transferrin and the EGF receptors and HRP suggested broad modifications of clathrin-dependent and -independent endocytosis as well as increased fluid phase internalization (Cataldo et al., 2008).

We found an increase of size of EEA1- and Rab5-positive endosomes in peripheral blood mononuclear cells, in lymphoblastoid cell lines and in fibroblasts from individuals with DS (Cossec et al., 2012). Rab5-positive early endosomes are also enlarged in primary BFCN (Basal Forebrain Cholinergic Neurons) from Ts65Dn mice (Xu et al., 2016).

We then wondered whether endosomal perturbations would be present in peripheral cells from AD patients. We analyzed peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts from AD patients with mild cognitive impairment or dementia and found an increase in the volume of EEA1-positive endosomes (Corlier et al., 2015, Cossec et al., 2012). However, the range of these changes was much lower in AD peripheral cells as compared to DS (Table 2).

In mouse models of AD and DS, similar endosomal phenotypes were identified. Immunolabelling with antibodies against Rab5 showed a 2.42-fold and 1.52-fold increase of size in APP mice carrying the Swedish and the London mutations respectively (Choi et al., 2013). In the Ts65Dn mice modelling DS, we found a 19% significant increase in the mean endosome area in the basal forebrain cholinergic neurons of the medial septum nucleus (unpublished data).

Cell type	Down syndrome % of increase of endosomal size	Sporadic AD % of increase of endosomal size
Peripheral blood mononuclear cells	31	9
Lymphoblastoid cell lines	22	
Fibroblasts	30	16

Table 2. Enlarged endosome phenotype in peripheral cells in DS and in sporadic AD.

Late endosomes & lysosomes

Numerous reports showed late endosomes and lysosomes dysfunction in AD, reviewed in (Colacurcio et al., 2018). It includes increased level of Rab7 (Ginsberg et al., 2010a) and endo-lysosomal-associated lipids (Chan et al., 2012), abnormal acid hydrolase expression and location to amyloid deposits (Cataldo et al., 1995, Cataldo et al., 1996, Ginsberg et al., 2010a), default in pH acidification due to presenilin-1 and V-ATPase dysfunction in AD brains and AD mouse model (Avrahami et al., 2013, Coffey et al., 2014, Lee et al., 2010, Lee et al., 2015), accumulation of APP proteolytic products in lysosomes of neurons from the brain of AD patients and mouse models (Langui et al., 2004, Lauritzen et al., 2012, Lauritzen et al., 2016, Torres et al., 2012). A recent study showed that mutations in APP and PSEN1 disrupt lysosome and autophagy functioning in human neurons derived from iPSCs, and that lowering levels of APP- β CTF rescues these phenotypes (Hung and Livesey, 2018). In this article, the effect of mutations on the early endosomes was assessed by overexpressing Rab5-GFP, for live imaging purpose. It is noteworthy that overexpressing master regulators of the endosomal pathway has major consequences on organelles functioning. Rab5 overexpression causes increased early endosome fusion, hindering morphological and biochemical measurements (Hung and Livesey, 2018). Nevertheless, the literature showed that lysosomal dysfunctions and APP interact negatively, and the initiating event is not clearly identified. This study provides evidence that APP can be causal for lysosomal defects in familial AD (Hung and Livesey, 2018).

Despite extensive literature on endosomal maturation and lysosomal defects in AD, less evidence was reported in DS. Larger and more abundant Rab7- and LBPA-positive late endosomes were observed in DS fibroblasts and in frontal cortex neurons of brains from individuals with DS or sporadic AD when compared to controls (Cataldo et al., 2008). Increased

Rab7 levels in DS fibroblasts linked to upstream upregulation of endocytosis was also detected (Cataldo et al., 2008). Lysosomal acid hydrolase Cathepsin-D was found to relocate to earlier compartments in DS fibroblasts, and its overall level and activity was increased in these cells (Cataldo et al., 2008). As observed in AD, Cathepsin-D is found in amyloid deposits in brains of individuals with DS (Cataldo et al., 1996). Additionally, Cathepsin-D and V-ATPase oxidation is increased in the brain of individuals with DS (Di Domenico et al., 2013).

Several parameters influence the intraluminal pH of lysosomes, such as lysosome location in the cytoplasm and cell type (Johnson et al., 2016). Precise pH measurement is central in lysosomal function evaluation, yet it is challenged by the highly dynamic nature of endo-lysosomal organelles. The comprehension of lysosomal dysfunction in DS would be greatly pushed forward by the use of pH-sensitive probes enabling live recording or kinetic chase of endo-lysosomal acidification (Sepulveda et al., 2009).

MVB targeting to the plasma membrane leads to exosome secretion in the extracellular space. In DS, enhanced exosome secretion was identified in the brain from individuals with DS (Gauthier et al., 2017). This phenotype was protective against endosomal enlargement in DS fibroblasts. Exosomes produced by neurons and purified from the blood of individuals with DS are enriched in A β ₄₂ and phosphorylated tau (Hamlett et al., 2017) (Figure 1).

Retromer

Retromer dysfunction was first identified in AD showing that Vps35 and Vps26 levels were decreased in the entorhinal cortex of AD patients (Small et al., 2005). Polymorphism in the *SORL1* gene, a member of the retromer family, was found to be implicated in AD (Dodson et al., 2006, Kimura et al., 2009, Lambert et al., 2013, Rogaeva et al., 2007). Furthermore, variants of genes encoding regulators of the retromer complex were identified in AD, including SNX1, SNX3 and Rab7 (Vardarajan et al., 2012). Thus, deregulation of the retromer complex is associated to AD pathogenesis, likely by altering APP trafficking. Indeed, APP is known to be a cargo undergoing retromer sorting (Vieira et al., 2010). It is hypothesized that impaired APP sorting out of the endosomes increases co-residency time between APP and secretases in the endosomes, thus increasing A β production (Small and Petsko, 2015). Finally, PI(3)P decrease evidenced in AD brains could negatively impact SNX recruitment to endosomal membranes and disrupt retromer-mediated cargo sorting (Morel et al., 2013).

In DS, the main evidence of retromer dysfunction lies in SNX27 deregulation (Figure 1). SNX27 is linked to cargo recycling to the plasma membrane (Temkin et al., 2011). A study showed that SNX27 level is abnormally decreased in the brain from individuals with DS because of an increased miRNA-155 encoded on HSA21 that negatively regulates a SNX27 transcription factor (Wang et al., 2013). SNX27^{+/-} mice exhibit deficits in learning and memory as well as synaptic dysfunction. These phenotypes observed in the Ts65Dn mouse model were rescued by SNX27 upregulation in the hippocampus of Ts65Dn mice (Wang et al., 2013). SNX27 prevents A β production by binding presenilin-1 and promoting γ -secretase complex dissociation (Wang et al., 2014). These studies show that retromer dysfunction may participate in abnormal APP trafficking and cognitive dysfunction in DS, again pointing towards a synergic deregulation of various genes mapping to HSA21.

Endo-lysosomal defects in DS: implications for neuronal trafficking

BFCN present age-related degeneration in both AD and DS, responsible for cognitive impairments related to AD. It was largely shown that degeneration of the septohippocampal cholinergic system can cause memory deficits in rats (Browne et al., 2001), and the study of *post-mortem* brains of AD patients also show a correlation between degeneration of the cholinergic system and cognitive impairments (Baskin et al., 1999). The degenerative process, occurring in the early stages of AD (Geula et al., 2008), might be caused by a specific accumulation of A β ₄₂ in these neurons (Baker-Nigh et al., 2015). Thus, this neuronal network has been widely studied in AD and DS.

A number of studies showed a link between endo-lysosomal modification and trafficking of neurotrophin in neurons in DS condition. In DS, Ts65Dn and Ts1Cje mice exhibit altered trafficking of NGF (Neural Growth Factor) in BFCN and BFCN degeneration linked to increased APP expression in these mice (Cooper et al., 2001, Salehi et al., 2006, Xu et al., 2016). In Ts65Dn mice, NGF is contained in enlarged endosomes (Salehi et al., 2006), suggesting that endosomal swelling could lead to cholinergic neurons degeneration. More recently, it was found that APP-induced Rab5 activation disrupts NGF trafficking, rescued by expression of inactive Rab5 (Xu et al., 2016). Together, these studies show that neurotrophin trafficking is impaired in AD and DS, and that APP is involved in these defects (Chen et al., 2018). APP and PSEN1 mutations were recently linked to decreased lysosomal movements and enlarged size in axons of human neurons derived from iPSCs (Hung and Livesey, 2018).

Endo-lysosomal dysfunction were observed in both peripheral cells and neurons in DS and AD. These studies demonstrate that abnormal endosomes and lysosomes participate to degeneration linked to cognitive impairments in DS and AD.

Genes related to endosomal abnormalities in DS

APP

APP is a type-I transmembrane protein encoded by the *APP* gene mapping to HSA21. Several isoforms of APP are produced by alternative splicing, designated by their number of amino acid residues. The APP₆₉₅ isoform is mainly expressed in neurons (Sisodia et al., 1993), while APP₇₅₁ and APP₇₇₀ isoforms are expressed in other cell types. After synthesis, immature APP proteins undergo numerous post-translational modifications in the secretory pathway, where the majority of APP is localized (Caporaso et al., 1994). A fraction of total APP is then targeted to the plasma membrane by carrier vesicles. Plasma membrane localization of APP is transient, as it is rapidly either cleaved by α -secretase (Sisodia, 1992) or internalized in the endo-lysosomal pathway (Haass et al., 1992a).

APP undergoes two main types of processing: non-amyloidogenic or amyloidogenic (Haass and Selkoe, 1993). The majority of APP is cleaved at the plasma membrane in the non-amyloidogenic pathway, due to high concentration of α -secretase (Sisodia, 1992). The non-amyloidogenic pathway is initiated by cleavage of full-length APP in its A β domain by α -secretase (Sisodia et al., 1990), generating a membrane-anchored fragment (α -CTF or C83) and releasing sAPP α . C83 is then cleaved by γ -secretase, releasing p3 fragment and AICD (APP Intracellular Domain) (De Strooper and Annaert, 2010). The uncleaved APP at the plasma membrane is internalized in the endocytic pathway and likely follows amyloidogenic cleavage in intracellular compartments. The amyloidogenic pathway starts with β -secretase cleavage by BACE1 on the N-terminal part of the A β domain (Sinha et al., 1999, Vassar et al., 1999), releasing sAPP β from a membrane-anchored fragment named β -CTF or C99, which is subsequently cleaved by γ -secretase to release A β in the intraluminal space and AICD in the cytosol. The cleavage of C99 by γ -secretase occurs at different positions, resulting in the generation of A β peptides of various lengths (38-42 mainly) (De Strooper and Annaert, 2010). The prevailing forms are A β ₄₀ and A β ₄₂, but shorter and longer species are produced as well.

In AD, the balance tips toward increased production of pathogenic A β ₄₂, a more hydrophobic and aggregation-prone specie than the shorter ones (Burdick et al., 1992).

APP processing is dependent on its colocalization with secretases within intracellular compartments. After maturation and secretion, BACE1 is targeted to the plasma membrane, in lipid rafts. The association of APP and BACE1 in lipid rafts is thought to participate to A β production (Cordy et al., 2003, Eehalt et al., 2003, Marquer et al., 2011) although not fully essential (Vetrivel et al., 2009). BACE1 is then internalized in the endosomal compartment by interaction of endocytosis adaptors to BACE1 dileucine sorting domain (Huse et al., 2000). Optimal proteolytic activity of BACE1 is reached at acidic pH (Vassar et al., 1999), corresponding to the endosomal lumen environment (Galloway et al., 1983). Interaction between APP and BACE1 in endosomes results in β -CTF accumulation in the endo-lysosomal pathway (Golde et al., 1992, Haass et al., 1992a, Kinoshita et al., 2003). Assembled γ -secretase complex (including presenilins catalytic subunits) is active in the secretory pathway, at the plasma membrane and in the endo-lysosomal pathway (Haass et al., 2012). Endosomes are a major site of APP processing. Thus, deregulation of APP endocytosis and targeting impact pathogenic A β production (Cataldo et al., 2004, Cossec et al., 2010b, Koo and Squazzo, 1994, Miller et al., 2006, Perez et al., 1999). APP internalization is mediated by CME, through binding of adaptor proteins to APP C-terminal sorting motif YENPTY (Lai et al., 1995). Once APP reaches the early endosomes, it can be sorted in different exit routes: APP can recycle back to the plasma membrane, follow the maturation of endosomes toward the degradation pathway, or undergo retrograde transport to the trans-Golgi network (TGN).

Endo-lysosomal dysfunction is intertwined with APP processing and is particularly studied in DS. Enlarged endosomes in neurons from individuals with DS and AD patients are a site of A β production (Cataldo et al., 2004). The observation that early endosome alterations are triggered by mutations in the *APP* gene but not in the presenilin 1 and 2 genes in familial cases of AD suggested that APP is central to explain endocytic phenotypes (Cataldo et al., 2000, Cataldo et al., 2001). Accordingly, early endosome enlargement identified in BFCN of the Ts65Dn mouse model of DS is restored in Ts65Dn App^{+/+/-} and absent in Ts1Cje, a mouse model of DS with two copies of the *APP* gene (Cataldo et al., 2003). At the molecular level, APP overexpression induces endosomal enlargement while decreased APP expression reverses it. Specifically, modulating β CTF levels shows its implication in endocytic defects (Jiang et al., 2010). APP

promotes early endosome enlargement by activating Rab5 (Xu et al., 2016). A recent study proposed that increased levels in DS and AD promotes recruitment of APPL1 to early endosomes, where it stabilizes the active GTP-bound state of Rab5, eventually increasing early endosomes fusion and generating abnormally large early endosomes (Kim et al., 2016) (Figure 1). Another study reported that overexpression of APP^{M596V} (preventing β -cleavage and β CTF production) also leads to Rab5 activation and early endosomes enlargement (Xu et al., 2016) which was not the case in a previous study (Kim et al., 2016), suggesting that abnormal Rab5 activation can be β CTF-independent as well.

As mentioned previously, APPL1-positive endosomes are distinct from EEA1-positive endosomes. Whether the proposed mechanism applies to all early endosome sub-populations in DS and AD remains to be determined. The role of increased β CTF in endosomal abnormalities may not translate to cognitive deficits since γ -secretase inhibitors lower A β , increase β CTF and rescue cognitive deficits in Ts65Dn mice (Netzer et al., 2010).

APP gene dosage appears to be important in AD development in the DS population. Studies showed that *APP* duplication in euploid individuals is responsible for AD development (Rovelet-Lecrux et al., 2006, Sleegers et al., 2006). Conversely, partial trisomy lacking the *APP* gene is not associated with AD (Prasher et al., 1998). Recently, a 72-year-old (age of death) individual with DS with partial trisomy excluding the *APP* gene was reported as non-demented (Doran et al., 2017). In cell models of *APP* duplication, conflicting results were obtained. Abnormal endosomal enlargement is found in iPSC derived from fibroblasts but not in lymphoblastoid cell lines from individuals with *APP* microduplication (Cossec et al., 2012, Israel et al., 2012). However, several lines of evidence suggest that other triplicated genes from HSA 21 participate to endocytic defects and AD development. Transgenic mice overexpressing Swedish or Swedish and London mutations of human *APP* associated with AD did not exhibit abnormal endosomes (Cataldo et al., 2003). It was recently shown that a mouse model carrying a partial triplication of chromosome 21 exempt of *APP* gene crossed with TgAPPsw/lid transgenic mouse strain accumulates more amyloid deposition and performed worse at cognitive assessments than TgAPPsw/lid alone. This study concludes that increased dosage of other genes than *APP* cause these defects through a shift of A β ₄₀/A β ₄₂ but independently of β CTF accumulation and secretases activity (Wiseman et al., 2018). Together, these studies suggest that *APP* overexpression is associated with other overexpressed genes in the development of endosomal dysfunction in DS.

Because of the role of APP in AD pathogenesis, triplication of the *APP* gene was an obvious culprit to understand endocytic defects in DS. However, trisomy of HSA21 leads to increased gene dosage of a number of genes, implicated directly or indirectly in DS phenotypes. Phenotype-genotype correlation identified a region carrying genes thought to be causative for DS phenotypes, named DSCR (Down Syndrome Critical Region) (Delabar et al., 1993). Notably, the *APP* gene is located in this region. However, other genes mapping to HSA21 deserve interest in the exploration of endosomal abnormalities in DS. At least two proteins encoded by genes mapping to HSA21 are direct regulators of endocytosis: Intersectin-1 (ITSN1) and Synaptojanin-1 (SYNJ1). We discuss here their implication in endosomal abnormalities in DS.

Intersectin-1

The *ITSN1* gene, located in the DSCR, encodes a short isoform and a long ITSN1 isoforms. Both isoforms present a modular protein domain structure: two EH domains (Eps15 Homology), a CC domain (Coiled-Coil) and five SH3 domains (Src Homology 3). The long isoform additionally holds a DH (Dbl Homology), a PH (Pleckstrin Homology) and a C2 domain. These domains mediate ITSN1 scaffolding function by binding numerous partners (Figure 1). ITSN1 interaction with dynamin via SH3 domains makes it part of both CME and caveolar endocytosis (Okamoto et al., 1999, Predescu et al., 2003). ITSN1 interacts with major members of the CME machinery such as AP2 (Pechstein et al., 2010), dynamin (Okamoto et al., 1999) or SYNJ1 (Tong et al., 2000). ITSN1 controls actin cytoskeleton polymerization through Cdc42 binding by activating N-WASP and Arp2/3 (Hussain et al., 2001, McGavin et al., 2001). These proteins are important regulators of endocytic vesicles formation during CME (Benesch et al., 2005, Merrifield et al., 2004), actin-dependent endosome movements (Benesch et al., 2002, Rozelle et al., 2000, Taunton et al., 2000) and endosomes morphology (Duleh and Welch, 2010). These results strongly link ITSN1 to endosome homeostasis. In addition, ITSN1 is involved in signaling pathways by interacting with members of the Ras GTPase family and receptor tyrosine kinase (Hunter et al., 2013). ITSN1 implication in endocytosis was demonstrated by overexpression and silencing experiments. Both lead to receptors internalization and endocytosis inhibition, indicating that any deregulation of ITSN1 level is deleterious for the endocytic function (Martin et al., 2006, Thomas et al., 2009, Yu et al., 2008).

As expected, *ITSN1* expression is increased in the brain of individuals with DS (Hunter et al., 2011, Pucharcos et al., 1999). Interestingly, *ITSN1* transcripts are also increased in the brain of AD patients (Dunckley et al., 2006, Wilmot et al., 2008). Despite *ITSN1* deregulation, no study to date directly addressed the contribution of *ITSN1* gene dosage to endocytic phenotypes in DS systems. Additional data regarding this protein will certainly contribute to a more global comprehension of endosomal dysfunction in DS.

Synaptojanin-1

The *SYNJ1* gene encodes two protein isoforms: SYNJ1-145kDa expressed in the brain and SYNJ1-170kDa ubiquitously expressed (Ramjaun and McPherson, 1996). Both isoforms are characterized by a SAC1 domain at the N-terminus, a central 5-phosphatase domain and a C-terminal proline-rich domain (McPherson et al., 1996). The role of the 145kDa isoform in endocytosis regulation and DS was the most extensively described and is reviewed hereafter. SYNJ1 is primarily defined as a 5-phosphatase that dephosphorylates PI(4,5)P₂ in PI(4)P, although its SAC1 domain is able to dephosphorylate phosphatidylinositol 3- and 4-monophosphate (PI(3)P & PI(4)P) and phosphatidylinositol 3,5 biphosphate (PI(3,5)P₂), and participate to SYNJ1 catalytic activity (Guo et al., 1999, Mani et al., 2007). PI(4,5)P₂ is involved a variety of cellular processes (Di Paolo and De Camilli, 2006), and has been particularly studied in the regulation of CME. The plasma membrane is enriched in PI(4,5)P₂ and various clathrin adaptors bind to PI(4,5)P₂ during endocytosis initiation (Schink et al., 2016) including *ITSN1*. Additionally, PI(4,5)P₂ is involved in dynamin recruitment at the neck of clathrin-coated pits (Jost et al., 1998). In the later steps of CME, PI(4,5)P₂ - PI(4)P conversion by SYNJ1 is essential in clathrin-coated vesicles uncoating (Figure 1). It was particularly studied at the synapse of SYNJ1 knock-out neurons, where clathrin-coated vesicles accumulate and thus recycling of synaptic vesicles is delayed (Cremona et al., 1999, Kim et al., 2002, Mani et al., 2007).

SYNJ1 overexpression leads to early endosome enlargement in neuroblastoma cells (Cossec et al., 2012). In addition, SYNJ1 silencing in fibroblasts from an individual with DS partially rescued the endosomal phenotype, suggesting that SYNJ1 overexpression is involved in endosomal abnormalities in DS (Cossec et al., 2012). Tg(*SYNJ1*) mice exhibit enlarged endosomes (Cossec et al., 2012), as well as altered spatial memory (Voronov et al., 2008), hippocampal hyperexcitability and unstable place fields (Miranda et al., 2018). In *post-mortem*

brain tissue from individuals with DS and AD, SYNJ1 levels were inversely correlated with synaptophysin levels but no correlation was found in younger individuals with DS, suggesting that SYNJ1 is associated with synaptic dysfunction during AD development in the DS population (Miranda et al., 2018). In addition to increased level of SYNJ1 in DS, SYNJ1 level was further increased in individuals with both DS and AD (Martin et al., 2014). In addition to SYNJ1 increased gene dosage, SYNJ1 activity is upregulated by DYRK1A, another gene mapping to HSA21 (Chen et al., 2014b).

In AD context, A β downregulates PI(4,5)P₂ levels *in vitro* and A β -induced long term potentiation inhibition is restored in SYNJ1^{+/-} mice (Berman et al., 2008). Reduction of SYNJ1 also rescues learning and memory deficits in mouse models of familial AD (McIntire et al., 2012, Zhu et al., 2013). Recently, it was demonstrated that *SYNJ1* polymorphism is associated with memory deficit and disease onset in familial AD (Miranda et al., 2018). In addition, SYNJ1 expression is increased in *post-mortem* brain tissue of sporadic AD APOE4 carriers, at high risk for AD. Lowering SYNJ1 levels in APOE4-KI mice reverses PI(4,5)P₂ levels and cognitive deficits of these mice (Zhu et al., 2015). In AD brains, granuvacuolar degeneration bodies and neurofibrillary tangles were found to be enriched in PI(4,5)P₂ (Nishikawa et al., 2014). Together these findings strongly suggest that SYNJ1, in addition to APP, is associated with cellular dysfunction and AD pathogenesis in both sporadic AD, familial AD and DS. However, mechanisms underlying SYNJ1 contribution to AD development in the general population and in DS population remain to be elucidated.

Interestingly, mutations in the SAC1 domain of the *SYNJ1* gene were identified in familial cases of early-onset Parkinson's disease (Kirola et al., 2016, Krebs et al., 2013, Olgiati et al., 2014, Quadri et al., 2013). The R258Q mutation prevents dephosphorylation of PI(3)P and PI(4)P by SYNJ1, while the 5-phosphatase activity is intact (Krebs et al., 2013) consistently with previous studies on SAC1 catalytic activity (Guo et al., 1999, Nemoto et al., 2000). A recent study showed that the R258Q mutation impairs autophagosome biogenesis (Vanhauwaert et al., 2017) likely because of PI(3)P and PI(3,5)P₂ deregulation. SAC1 mutations highlight the dual regulation of phosphoinositides homeostasis by SYNJ1 and raises interest on phosphoinositides deregulation on other compartments dependent on PI(3)P, PI(4)P and PI(3,5)P₂ in DS context.

Deregulation of phosphoinositides homeostasis is increasingly associated with neurological disorders. Phosphoinositides represent a small proportion of all phospholipids but are key regulators of vesicular trafficking, signaling pathways and ion channels. Phosphoinositides are

phosphorylated derivatives of phosphatidylinositol. Seven phosphoinositides compose this family of lipids: PI(3)P, PI(4)P, PI(5)P, PI(3,4)P₂, PI(4,5)P₂, PI(3,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃. They are produced by a variety of kinases and phosphatases that regulate their specific concentrations. Phosphoinositides have specific localizations on cellular membranes where they interact with a set of effectors. Several phosphoinositides are resident and regulators of the endosomal membranes. As resumed above, the first major phosphoinositide in the endocytic pathway is PI(4,5)P₂. PI(4,5)P₂ is located at the plasma membrane and the membrane of newly formed endocytic vesicles. Sequential dephosphorylation of PI(4,5)P₂ and PI(4)P by 5- and 4-phosphatases including SYNJ1 occurs as endocytic vesicles are transported away from the cell periphery to reach early endosomes. Early endosomes are enriched in PI(3)P. Most of the endosomal pool of PI(3)P is produced from PI by the Vps34 complex at the early endosome membrane upon Rab5 activation. Rab5 can also promote PI(3)P production by activation of phosphoinositol 4- and 5- phosphatases (Shin et al., 2005). In the degradation pathway, PI(3)P is either dephosphorylated, back to PI, phosphorylated in PI(3,5)P₂ by PIKfyve, or internalized in ILV (Stenmark and Gillooly, 2001). Numerous studies identified phosphoinositides deregulation in AD, reviewed in (Waugh, 2015). PI(3)P, PI(4)P, PI(4,5)P₂ and PI(3,4,5)P₃ were linked to AD. Among these phosphoinositides, PI(4,5)P₂ and PI(3)P are involved in endocytosis and endosomal trafficking. To date, our knowledge of phosphoinositides imbalance in DS is limited to PI(4,5)P₂. Other species of phosphoinositides of the endosomal pathway could be affected in DS, by direct or indirect overexpression of HSA21 genes. For instance, APP was recently identified as a binding partner and modulator of the PIKfyve kinase (Balklava et al., 2015, Currinn et al., 2016, Currinn and Wassmer, 2016), a major regulator of endosomal maturation (de Lartigue et al., 2009, Jefferies et al., 2008). Furthermore, PI(3)P controls the sorting of APP towards late endosomes (Morel et al., 2013). PI(3)P level is decreased in brain from AD patients and AD mouse models, certainly leading to defective APP targeting in MVBs and enhanced amyloidogenic cleavage (Morel et al., 2013). Considering the major impact of phosphoinositides on intracellular trafficking, investigating their regulation will certainly contribute to a better comprehension of abnormal cellular phenotypes in DS.

Current and emerging models to explore endosomes in DS: limitations and perspectives

Post-mortem brain tissue

Endosomal swelling was first identified in *post-mortem* brain tissue from individuals with DS or AD, with particularly short *post-mortem* delays. The study of *post-mortem* tissue is essential, for it directly reflects neuropathological abnormalities. However, this system is technically limited. First, the staining quality of *post-mortem* tissue is highly dependent on the quality of the tissue, itself dependent on the *post-mortem* delay and the time spent in fixative solution. Obtaining conclusive staining on *post-mortem* tissue is often problematic. Second, staining of *post-mortem* tissue is generally designed for bright-field microscopy. This imaging technic limits the number of possible co-stainings. More importantly, the accumulation of autofluorescent lipofuscin in neurons from older individuals hampers fluorescent staining. Organelles of the endo-lysosomal pathway often have a size range below the resolution limit of conventional light microscopy (~ 200 nm), impossible to overcome without fluorescence microscopy. However, recent fluorescence imaging technics are increasingly performant at overcoming this issue and will allow high-quality 3D imaging of neurons from *post-mortem* tissue. Notably, super-resolution imaging of endo-lysosomal organelles using technics such as SIM (Structured Illumination Microscopy) or STED (Stimulated Emission Depletion) will bring valuable insight into endosomal morphology in DS. Third, the endo-lysosomal system is dynamic and that aspect is impossible to appreciate in fixed cells such as neurons from *post-mortem* tissue.

Cellular models

The use of peripheral cell models provided by individuals with DS is intrinsically limited as they cannot reflect neuron-specific processes underlying cognitive impairment and neurodegeneration in DS. When characterizing the endosomal system, it is important to bear in mind that endosome homeostasis is highly variable between cell types. Additionally, the stability of endosomal phenotypes is questionable. Homeostasis of the endosomal system is tightly regulated and can vary with cell passages. The use of human DS neurons derived from iPSCs will bring new insights on cellular disturbances in DS. An expanding number of studies use this type of model in AD and DS. Early endosome swelling was found in human neurons derived from iPSC from patients with familial and sporadic AD (Israel et al., 2012) and

organoids derived from patients with familial AD (Raja et al., 2016). Recently, the effect of APP processing on the endo-lysosomal and autophagy pathways were investigated in human neurons derived from iPSC from familial AD patients (Hung and Livesey, 2018). In DS, several studies used iPSC and showed neuronal and glial anomalies, as well as AD pathology (Chen et al., 2014a, Huo et al., 2018, Shi et al., 2012, Weick et al., 2013). Characterization of the endo-lysosomal pathway in cultured iPSC-derived human neurons from individuals with DS is yet to come. This model would allow high-resolution and live imaging of the organelles in neurons, so far arduous or simply impossible to achieve on *post-mortem* tissues.

Mouse models

HSA21 has orthologous regions on mouse chromosomes Mmu16, 17 and 10. Endosome morphology was explored in two mouse models of DS: Ts65Dn and Ts1Cje. The most characterized and used model of DS is the Ts65Dn (Davisson et al., 1990, Reeves et al., 1995). Ts65Dn mice have an extra chromosome resulting from the fusion of the region of Mmu16 orthologous to HSA21 with the centromeric region of Mmu17 (a part from which is not related to DS) (Duchon et al., 2011b). The segment of Mmu16 triplicated in Ts65Dn carries the *App* gene and the DSCR. Early endosome enlargement was identified in these mice (Cataldo et al., 2003). The Ts1Cje mouse model of DS also carries a partial trisomy of Mmu16 but lacks the *APP* gene region. Ts1Cje mice do not exhibit endosomal enlargement (Cataldo et al., 2003). Unraveling which genes cause endosomal abnormalities in mouse models would greatly benefit from phenotype-genotype correlation. Additionally, mouse models used to analyze endosomal dysfunction are trisomic for only part of the genes triplicated in DS (90 homologous genes in Ts65Dn, with triplication of 60 non-DS-related genes and no triplicated genes mapping to Mmu17 and Mmu10). Innovative mouse models, such as the triple trisomic (TTS) (Belichenko et al., 2015, Yu et al., 2010), and the segmental duplications of Mmu17 and Mmu10 (Duchon et al., 2011a, Herault et al., 2012) will certainly accelerate the identification of genetic bases of endosomal dysfunction in DS.

Endo-lysosomal biomarkers in DS

While morphological modifications of the endosomal compartment in peripheral cells (increase in size and number in fibroblasts and peripheral blood mononuclear cells) can distinguish

between individuals with DS and controls, in cells from AD patients the variation is less pronounced, thus precluding the use of endosomal morphology as a cellular peripheral biomarker in AD (Table 2). However, elevated levels of inactive Cathepsin-D released from degenerative neurons were found in the CSF (CerebroSpinal Fluid) of AD patients (Schwagerl et al., 1995). In other cohorts of AD patients, six proteins were significantly increased: EEA1, LAMP1 and LAMP2, microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3), Rab3 and Rab7 (Armstrong et al., 2014). These proteins from the endo-lysosomal machinery network are potential AD biomarkers to investigate endo-lysosomal changes in AD pathogenesis. Those studies have not been yet conducted in individuals with DS. Future proteomic studies using an engineered peroxidase APEX targeted to the endosomal compartment will be necessary to unveil molecular biomarkers of the endosomal dysfunction in DS and AD (Hung et al., 2016, Lobingier et al., 2017).

Conclusion and perspectives

Identification of the complex mechanisms of endo-lysosomal dysfunctions in DS and AD has become a challenge in the past years. Useful models were developed, however, these models are not completely suited for the analysis of cellular processes. Future work on endo-lysosomal dysfunction in DS will benefit from technological advances in cell biology research, such as super-resolution to fully characterize endosome morphology, and live imaging to appreciate the dynamic aspect of this compartment. Human neurons derived from iPSC will allow to explore molecular abnormalities in a system more relevant for neurodegeneration.

Endosomes are considered as a hub for cargo targeting and signaling. The role of APP metabolites in the triggering of endosomal abnormalities in AD and DS has been investigated and evidences were found in this direction (Cataldo et al., 2001, Jiang et al., 2010, Kim et al., 2016). However, the intricacy of endosomal regulation added to numerous overexpressed genes in DS leads to dysregulations at multiple levels. A number of genetic polymorphisms and risk factors are involved in both endocytosis and AD, suggesting that APP alone is insufficient to encompass endosomal dysfunctions. Emerging opinions consider endosomal dysfunctions as an initiating event in defective APP processing and AD pathogenesis (Small et al., 2017). Future studies will unveil molecular bases of dementia development in DS beyond APP.

References

- ANDO, K., BRION, J. P., STYGELBOUT, V., SUAIN, V., AUTHELET, M., DEDECKER, R., CHANUT, A., LACOR, P., LAVAUR, J., SAZDOVITCH, V., ROGAEVA, E., POTIER, M. C. & DUYCKAERTS, C. 2013. Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol*, 125, 861-78.
- ANDO, K., TOMIMURA, K., SAZDOVITCH, V., SUAIN, V., YILMAZ, Z., AUTHELET, M., NDJIM, M., VERGARA, C., BELKOUCH, M., POTIER, M. C., DUYCKAERTS, C. & BRION, J. P. 2016. Level of PICALM, a key component of clathrin-mediated endocytosis, is correlated with levels of phosphotau and autophagy-related proteins and is associated with tau inclusions in AD, PSP and Pick disease. *Neurobiol Dis*, 94, 32-43.
- ARMSTRONG, A., MATTSSON, N., APPELQVIST, H., JANEFJORD, C., SANDIN, L., AGHOLME, L., OLSSON, B., SVENSSON, S., BLENNOW, K., ZETTERBERG, H. & KAGEDAL, K. 2014. Lysosomal network proteins as potential novel CSF biomarkers for Alzheimer's disease. *Neuromolecular Med*, 16, 150-60.
- AVRAHAMI, L., FARFARA, D., SHAHAM-KOL, M., VASSAR, R., FRENKEL, D. & ELDAR-FINKELMAN, H. 2013. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 ameliorates beta-amyloid pathology and restores lysosomal acidification and mammalian target of rapamycin activity in the Alzheimer disease mouse model: in vivo and in vitro studies. *J Biol Chem*, 288, 1295-306.
- BACHE, K. G., BRECH, A., MEHLUM, A. & STENMARK, H. 2003a. Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *J Cell Biol*, 162, 435-42.
- BACHE, K. G., RAIBORG, C., MEHLUM, A. & STENMARK, H. 2003b. STAM and Hrs are subunits of a multivalent ubiquitin-binding complex on early endosomes. *J Biol Chem*, 278, 12513-21.
- BAKER-NIGH, A., VAHEDI, S., DAVIS, E. G., WEINTRAUB, S., BIGIO, E. H., KLEIN, W. L. & GEULA, C. 2015. Neuronal amyloid-beta accumulation within cholinergic basal forebrain in ageing and Alzheimer's disease. *Brain*, 138, 1722-37.
- BALKLAVA, Z., NIEHAGE, C., CURRINN, H., MELLOR, L., GUSCOTT, B., POULIN, G., HOFLACK, B. & WASSMER, T. 2015. The Amyloid Precursor Protein Controls PIKfyve Function. *PLoS One*, 10, e0130485.
- BASKIN, D. S., BROWNING, J. L., PIROZZOLO, F. J., KORPORAAL, S., BASKIN, J. A. & APPEL, S. H. 1999. Brain choline acetyltransferase and mental function in Alzheimer disease. *Arch Neurol*, 56, 1121-3.
- BELICHENKO, P. V., KLESCHEVNIKOV, A. M., BECKER, A., WAGNER, G. E., LYSENKO, L. V., YU, Y. E. & MOBLEY, W. C. 2015. Down Syndrome Cognitive Phenotypes Modeled in Mice Trisomic for All HSA 21 Homologues. *PLoS One*, 10, e0134861.
- BENESCH, S., LOMMEL, S., STEFFEN, A., STRADAL, T. E., SCAPLEHORN, N., WAY, M., WEHLAND, J. & ROTTNER, K. 2002. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate (PIP₂)-induced vesicle movement depends on N-WASP and involves Nck, WIP, and Grb2. *J Biol Chem*, 277, 37771-6.
- BENESCH, S., POLO, S., LAI, F. P., ANDERSON, K. I., STRADAL, T. E., WEHLAND, J. & ROTTNER, K. 2005. N-WASP deficiency impairs EGF internalization and actin assembly at clathrin-coated pits. *J Cell Sci*, 118, 3103-15.
- BERMAN, D. E., DALL'ARMI, C., VORONOV, S. V., MCINTIRE, L. B., ZHANG, H., MOORE, A. Z., STANISZEWSKI, A., ARANCIO, O., KIM, T. W. & DI PAOLO, G. 2008. Oligomeric amyloid-beta peptide disrupts phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate metabolism. *Nat Neurosci*, 11, 547-54.
- BROWNE, S. E., LIN, L., MATTSSON, A., GEORGIEVSKA, B. & ISACSON, O. 2001. Selective antibody-induced cholinergic cell and synapse loss produce sustained hippocampal and cortical hypometabolism with correlated cognitive deficits. *Exp Neurol*, 170, 36-47.
- BUCCI, C., PARTON, R. G., MATHER, I. H., STUNNENBERG, H., SIMONS, K., HOFLACK, B. & ZERIAL, M. 1992. The small GTPase rab5 functions as a regulatory factor in the early endocytic pathway. *Cell*, 70, 715-28.
- BURD, C. G. & EMR, S. D. 1998. Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol Cell*, 2, 157-62.
- BURDA, P., PADILLA, S. M., SARKAR, S. & EMR, S. D. 2002. Retromer function in endosome-to-Golgi retrograde transport is regulated by the yeast Vps34 PtdIns 3-kinase. *J Cell Sci*, 115, 3889-900.

BURDICK, D., SOREGHAN, B., KWON, M., KOSMOSKI, J., KNAUER, M., HENSCHEN, A., YATES, J., COTMAN, C. & GLABE, C. 1992. Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. *J Biol Chem*, 267, 546-54.

CAPORASO, G. L., TAKEI, K., GANDY, S. E., MATTEOLI, M., MUNDIGL, O., GREENGARD, P. & DE CAMILLI, P. 1994. Morphologic and biochemical analysis of the intracellular trafficking of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 14, 3122-38.

CARMONA, S., HARDY, J. & GUERREIRO, R. 2018. The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handb Clin Neurol*, 148, 395-408.

CATALDO, A., REBECK, G. W., GHETRI, B., HULETTE, C., LIPPA, C., VAN BROECKHOVEN, C., VAN DUIJN, C., CRAS, P., BOGDANOVIC, N., BIRD, T., PETERHOFF, C. & NIXON, R. 2001. Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders. *Ann Neurol*, 50, 661-5.

CATALDO, A. M., BARNETT, J. L., BERMAN, S. A., LI, J., QUARLESS, S., BURSZTAJN, S., LIPPA, C. & NIXON, R. A. 1995. Gene expression and cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system. *Neuron*, 14, 671-80.

CATALDO, A. M., BARNETT, J. L., MANN, D. M. & NIXON, R. A. 1996. Colocalization of lysosomal hydrolase and beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum and striatum in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol*, 55, 704-15.

CATALDO, A. M., BARNETT, J. L., PIERONI, C. & 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*, 17, 6142-51.

CATALDO, A. M., MATHEWS, P. M., BOITEAU, A. B., HASSINGER, L. C., PETERHOFF, C. M., JIANG, Y., MULLANEY, K., NEVE, R. L., GRUENBERG, J. & NIXON, R. A. 2008. Down syndrome fibroblast model of Alzheimer-related endosome pathology: accelerated endocytosis promotes late endocytic defects. *Am J Pathol*, 173, 370-84.

CATALDO, A. M., PETANCESKA, S., PETERHOFF, C. M., TERIO, N. B., EPSTEIN, C. J., VILLAR, A., CARLSON, E. J., STAUFENBIEL, M. & NIXON, R. A. 2003. App gene dosage modulates endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16 mouse model of down syndrome. *J Neurosci*, 23, 6788-92.

CATALDO, A. M., PETANCESKA, S., TERIO, N. B., PETERHOFF, C. M., DURHAM, R., MERCKEN, M., MEHTA, P. D., BUXBAUM, J., HAROUTUNIAN, V. & NIXON, R. A. 2004. Abeta localization in abnormal endosomes: association with earliest Abeta elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging*, 25, 1263-72.

CATALDO, A. M., PETERHOFF, C. M., TRONCOSO, J. C., GOMEZ-ISLA, T., HYMAN, B. T. & 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, 277-86.

CHAN, R. B., OLIVEIRA, T. G., CORTES, E. P., HONIG, L. S., DUFF, K. E., SMALL, S. A., WENK, M. R., SHUI, G. & DI PAOLO, G. 2012. Comparative lipidomic analysis of mouse and human brain with Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 287, 2678-88.

CHAVRIER, P., PARTON, R. G., HAURI, H. P., SIMONS, K. & ZERIAL, M. 1990. Localization of low molecular weight GTP binding proteins to exocytic and endocytic compartments. *Cell*, 62, 317-29.

CHEN, C., JIANG, P., XUE, H., PETERSON, S. E., TRAN, H. T., MCCANN, A. E., PARAST, M. M., LI, S., PLEASURE, D. E., LAURENT, L. C., LORING, J. F., LIU, Y. & DENG, W. 2014a. Role of astroglia in Down's syndrome revealed by patient-derived human-induced pluripotent stem cells. *Nat Commun*, 5, 4430.

CHEN, C. K., BREGERE, C., PALUCH, J., LU, J. F., DICKMAN, D. K. & CHANG, K. T. 2014b. Activity-dependent facilitation of Synaptojanin and synaptic vesicle recycling by the Minibrain kinase. *Nat Commun*, 5, 4246.

CHEN, X. Q., SAWA, M. & MOBLEY, W. C. 2018. Dysregulation of neurotrophin signaling in the pathogenesis of Alzheimer disease and of Alzheimer disease in Down syndrome. *Free Radic Biol Med*, 114, 52-61.

CHOI, J. H., KAUR, G., MAZZELLA, M. J., MORALES-CORRALIZA, J., LEVY, E. & MATHEWS, P. M. 2013. Early endosomal abnormalities and cholinergic neuron degeneration in amyloid-beta protein precursor transgenic mice. *J Alzheimers Dis*, 34, 691-700.

CHRISTOFORIDIS, S., MIACZYNSKA, M., ASHMAN, K., WILM, M., ZHAO, L., YIP, S. C., WATERFIELD, M. D., BACKER, J. M. & ZERIAL, M. 1999. Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors. *Nat Cell Biol*, 1, 249-52.

COFFEY, E. E., BECKEL, J. M., LATIES, A. M. & MITCHELL, C. H. 2014. Lysosomal alkalization and dysfunction in human fibroblasts with the Alzheimer's disease-linked presenilin 1 A246E mutation can be reversed with cAMP. *Neuroscience*, 263, 111-24.

COLACURCIO, D. J., PENSALFINI, A., JIANG, Y. & NIXON, R. A. 2018. Dysfunction of autophagy and endosomal-lysosomal pathways: Roles in pathogenesis of Down syndrome and Alzheimer's Disease. *Free Radic Biol Med*, 114, 40-51.

COLOMBO, M., RAPOSO, G. & THERY, C. 2014. Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 30, 255-89.

COOPER, J. D., SALEHI, A., DELCROIX, J. D., HOWE, C. L., BELICHENKO, P. V., CHUA-COUZENS, J., KILBRIDGE, J. F., CARLSON, E. J., EPSTEIN, C. J. & MOBLEY, W. C. 2001. Failed retrograde transport of NGF in a mouse model of Down's syndrome: reversal of cholinergic neurodegenerative phenotypes following NGF infusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 10439-44.

CORDER, E. H., SAUNDERS, A. M., STRITTMATTER, W. J., SCHMECHEL, D. E., GASKELL, P. C., SMALL, G. W., ROSES, A. D., HAINES, J. L. & 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, 921-3.

CORDY, J. M., HUSSAIN, I., DINGWALL, C., HOOPER, N. M. & TURNER, A. J. 2003. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11735-40.

CORLIER, F., RIVALS, I., LAGARDE, J., HAMELIN, L., CORNE, H., DAUPHINOT, L., ANDO, K., COSSEC, J. C., FONTAINE, G., DOROTHEE, G., MALAPLATE-ARMAND, C., OLIVIER, J. L., DUBOIS, B., BOTTLAENDER, M., DUYCKAERTS, C., SARAZIN, M., POTIER, M. C. & CLINICAL IMABIO, T. 2015. Modifications of the endosomal compartment in peripheral blood mononuclear cells and fibroblasts from Alzheimer's disease patients. *Transl Psychiatry*, 5, e595.

COSSEC, J. C., LAVAU, J., BERMAN, D. E., RIVALS, I., HOISCHEN, A., STORA, S., RIPOLL, C., MIRCHER, C., GRATTAU, Y., OLIVOMARIN, J. C., DE CHAUMONT, F., LECOURTOIS, M., ANTONARAKIS, S. E., VELTMAN, J. A., DELABAR, J. M., DUYCKAERTS, C., DI PAOLO, G. & POTIER, M. C. 2012. Trisomy for synaptojanin1 in Down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. *Hum Mol Genet*, 21, 3156-72.

COSSEC, J. C., MARQUER, C., PANCHAL, M., LAZAR, A. N., DUYCKAERTS, C. & POTIER, M. C. 2010a. Cholesterol changes in Alzheimer's disease: methods of analysis and impact on the formation of enlarged endosomes. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 839-45.

COSSEC, J. C., SIMON, A., MARQUER, C., MOLDRICH, R. X., LETERRIER, C., ROSSIER, J., DUYCKAERTS, C., LENKEI, Z. & POTIER, M. C. 2010b. Clathrin-dependent APP endocytosis and Abeta secretion are highly sensitive to the level of plasma membrane cholesterol. *Biochim Biophys Acta*, 1801, 846-52.

COZIER, G. E., CARLTON, J., MCGREGOR, A. H., GLEESON, P. A., TEASDALE, R. D., MELLOR, H. & CULLEN, P. J. 2002. The phox homology (PX) domain-dependent, 3-phosphoinositide-mediated association of sorting nexin-1 with an early sorting endosomal compartment is required for its ability to regulate epidermal growth factor receptor degradation. *J Biol Chem*, 277, 48730-6.

CREMONA, O., DI PAOLO, G., WENK, M. R., LUTHI, A., KIM, W. T., TAKEI, K., DANIELL, L., NEMOTO, Y., SHEARS, S. B., FLAVELL, R. A., MCCORMICK, D. A. & DE CAMILLI, P. 1999. Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell*, 99, 179-88.

CURRINN, H., GUSCOTT, B., BALKLAVA, Z., ROTHNIE, A. & WASSMER, T. 2016. APP controls the formation of PI(3,5)P(2) vesicles through its binding of the PIKfyve complex. *Cell Mol Life Sci*, 73, 393-408.

CURRINN, H. & WASSMER, T. 2016. The amyloid precursor protein (APP) binds the PIKfyve complex and modulates its function. *Biochem Soc Trans*, 44, 185-90.

DAVISSON, M. T., SCHMIDT, C. & AKESON, E. C. 1990. Segmental trisomy of murine chromosome 16: a new model system for studying Down syndrome. *Prog Clin Biol Res*, 360, 263-80.

DE LARTIGUE, J., POLSON, H., FELDMAN, M., SHOKAT, K., TOOZE, S. A., URBE, S. & CLAGUE, M. J. 2009. PIKfyve regulation of endosome-linked pathways. *Traffic*, 10, 883-93.

DE STROOPER, B. & ANNAERT, W. 2010. Novel research horizons for presenilins and gamma-secretases in cell biology and disease. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 26, 235-60.

DELABAR, J. M., THEOPHILE, D., RAHMANI, Z., CHETTOUH, Z., BLOUIN, J. L., PRIEUR, M., NOEL, B. & SINET, P. M. 1993. Molecular mapping of twenty-four features of Down syndrome on chromosome 21. *Eur J Hum Genet*, 1, 114-24.

DI DOMENICO, F., COCCIA, R., COCCIOLO, A., MURPHY, M. P., CENINI, G., HEAD, E., BUTTERFIELD, D. A., GIORGI, A., SCHININA, M. E., MANCUSO, C., CINI, C. & PERLUIGI, M. 2013. Impairment of proteostasis network in Down syndrome prior to the development of Alzheimer's disease neuropathology: redox proteomics analysis of human brain. *Biochim Biophys Acta*, 1832, 1249-59.

DI PAOLO, G. & DE CAMILLI, P. 2006. Phosphoinositides in cell regulation and membrane dynamics. *Nature*, 443, 651-7.

DODSON, S. E., GEARING, M., LIPPA, C. F., MONTINE, T. J., LEVEY, A. I. & LAH, J. J. 2006. LR11/SorLA expression is reduced in sporadic Alzheimer disease but not in familial Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 65, 866-72.

DORAN, E., KEATOR, D., HEAD, E., PHELAN, M. J., KIM, R., TOTOU, M., BARRIO, J. R., SMALL, G. W., POTKIN, S. G. & LOTT, I. T. 2017. Down Syndrome, Partial Trisomy 21, and Absence of Alzheimer's Disease: The Role of APP. *J Alzheimers Dis*, 56, 459-470.

DUCHON, A., POTHION, S., BRAULT, V., SHARP, A. J., TYBULEWICZ, V. L., FISHER, E. M. & HERAULT, Y. 2011a. The telomeric part of the human chromosome 21 from Cstb to Prmt2 is not necessary for the locomotor and short-term memory deficits observed in the Tc1 mouse model of Down syndrome. *Behav Brain Res*, 217, 271-81.

DUCHON, A., RAVEAU, M., CHEVALIER, C., NALESSO, V., SHARP, A. J. & HERAULT, Y. 2011b. Identification of the translocation breakpoints in the Ts65Dn and Ts1Cje mouse lines: relevance for modeling Down syndrome. *Mamm Genome*, 22, 674-84.

DULEH, S. N. & WELCH, M. D. 2010. WASH and the Arp2/3 complex regulate endosome shape and trafficking. *Cytoskeleton (Hoboken)*, 67, 193-206.

DUNCKLEY, T., BEACH, T. G., RAMSEY, K. E., GROVER, A., MASTROENI, D., WALKER, D. G., LAFLEUR, B. J., COON, K. D., BROWN, K. M., CASELLI, R., KUKULL, W., HIGDON, R., MCKEEL, D., MORRIS, J. C., HULETTE, C., SCHMECHEL, D., REIMAN, E. M., ROGERS, J. & STEPHAN, D. A. 2006. Gene expression correlates of neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 27, 1359-71.

DUYCKAERTS, C., DELATOUR, B. & POTIER, M. C. 2009. Classification and basic pathology of Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 118, 5-36.

EHEHALT, R., KELLER, P., HAASS, C., THIELE, C. & SIMONS, K. 2003. Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol*, 160, 113-23.

GALLOWAY, C. J., DEAN, G. E., MARSH, M., RUDNICK, G. & MELLMAN, I. 1983. Acidification of macrophage and fibroblast endocytic vesicles in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80, 3334-8.

GAULLIER, J. M., SIMONSEN, A., D'ARRIGO, A., BREMNES, B., STENMARK, H. & AASLAND, R. 1998. FYVE fingers bind PtdIns(3)P. *Nature*, 394, 432-3.

GAUTHIER, S. A., PEREZ-GONZALEZ, R., SHARMA, A., HUANG, F. K., ALLDRED, M. J., PAWLIK, M., KAUR, G., GINSBERG, S. D., NEUBERT, T. A. & LEVY, E. 2017. Enhanced

exosome secretion in Down syndrome brain - a protective mechanism to alleviate neuronal endosomal abnormalities. *Acta Neuropathol Commun*, 5, 65.

GAUTREAU, A., OGUIEVETSKAIA, K. & UNGERMANN, C. 2014. Function and regulation of the endosomal fusion and fission machineries. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6.

GEULA, C., NAGYKERY, N., NICHOLAS, A. & WU, C. K. 2008. Cholinergic neuronal and axonal abnormalities are present early in aging and in Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol*, 67, 309-18.

GILLOOLY, D. J., MORROW, I. C., LINDSAY, M., GOULD, R., BRYANT, N. J., GAULLIER, J. M., PARTON, R. G. & STENMARK, H. 2000. Localization of phosphatidylinositol 3-phosphate in yeast and mammalian cells. *Embo j*, 19, 4577-88.

GINSBERG, S. D., ALLDRED, M. J., COUNTS, S. E., CATALDO, A. M., NEVE, R. L., JIANG, Y., WUU, J., CHAO, M. V., MUFSON, E. J., NIXON, R. A. & CHE, S. 2010. Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression. *Biol Psychiatry*, 68, 885-93.

GOLDE, T. E., ESTUS, S., YOUNKIN, L. H., SELKOE, D. J. & YOUNKIN, S. G. 1992. Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science*, 255, 728-30.

GUO, S., STOLZ, L. E., LEMROW, S. M. & YORK, J. D. 1999. SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *J Biol Chem*, 274, 12990-5.

HAASS, C., KAETHER, C., THINAKARAN, G. & SISODIA, S. 2012. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2, a006270.

HAASS, C., KOO, E. H., MELLON, A., HUNG, A. Y. & SELKOE, D. J. 1992. Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature*, 357, 500-3.

HAASS, C. & SELKOE, D. J. 1993. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell*, 75, 1039-42.

HAMLETT, E. D., GOETZL, E. J., LEDREUX, A., VASILEVSKO, V., BOGER, H. A., LAROSA, A., CLARK, D., CARROLL, S. L., CARMONA-IRAGUI, M., FORTEA, J., MUFSON, E. J., SABBAGH, M., MOHAMMED, A. H., HARTLEY, D., DORAN, E., LOTT, I. T. & GRANHOLM, A. C. 2017. Neuronal exosomes reveal Alzheimer's disease biomarkers in Down syndrome. *Alzheimers Dement*, 13, 541-549.

HARBOUR, M. E., BREUSEGEM, S. Y., ANTROBUS, R., FREEMAN, C., REID, E. & SEAMAN, M. N. 2010. The cargo-selective retromer complex is a recruiting hub for protein complexes that regulate endosomal tubule dynamics. *J Cell Sci*, 123, 3703-17.

HERAULT, Y., DUCHON, A., VELOT, E., MARECHAL, D. & BRAULT, V. 2012. The in vivo Down syndrome genomic library in mouse. *Prog Brain Res*, 197, 169-97.

HORIUCHI, H., LIPPE, R., MCBRIDE, H. M., RUBINO, M., WOODMAN, P., STENMARK, H., RYBIN, V., WILM, M., ASHMAN, K., MANN, M. & ZERIAL, M. 1997. A novel Rab5 GDP/GTP exchange factor complexed to Rabaptin-5 links nucleotide exchange to effector recruitment and function. *Cell*, 90, 1149-59.

HUNG, C. O. Y. & LIVESEY, F. J. 2018. Altered gamma-Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease. *Cell Rep*, 25, 3647-3660.e2.

HUNG, V., UDESHI, N. D., LAM, S. S., LOH, K. H., COX, K. J., PEDRAM, K., CARR, S. A. & TING, A. Y. 2016. Spatially resolved proteomic mapping in living cells with the engineered peroxidase APEX2. *Nat Protoc*, 11, 456-75.

HUNTER, M. P., NELSON, M., KURZER, M., WANG, X., KRYSCIO, R. J., HEAD, E., PINNA, G. & O'BRYAN, J. P. 2011. Intersectin 1 contributes to phenotypes in vivo: implications for Down's syndrome. *Neuroreport*, 22, 767-72.

HUNTER, M. P., RUSSO, A. & O'BRYAN, J. P. 2013. Emerging roles for intersectin (ITSN) in regulating signaling and disease pathways. *Int J Mol Sci*, 14, 7829-52.

HUO, H. Q., QU, Z. Y., YUAN, F., MA, L., YAO, L., XU, M., HU, Y., JI, J., BHATTACHARYYA, A., ZHANG, S. C. & LIU, Y. 2018. Modeling Down Syndrome with Patient iPSCs Reveals Cellular and Migration Deficits of GABAergic Neurons. *Stem Cell Reports*, 10, 1251-1266.

HUSE, J. T., PIJAK, D. S., LESLIE, G. J., LEE, V. M. & DOMS, R. W. 2000. Maturation and endosomal targeting of beta-site amyloid precursor protein-cleaving enzyme. The Alzheimer's disease beta-secretase. *J Biol Chem*, 275, 33729-37.

HUSSAIN, N. K., JENNA, S., GLOGAUER, M., QUINN, C. C., WASIAK, S., GUIPPONI, M., ANTONARAKIS, S. E., KAY, B. K., STOSSEL, T. P., LAMARCHE-VANE, N. & MCPHERSON, P. S. 2001. Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat Cell Biol*, 3, 927-32.

IKONOMOV, O. C., SBRISSA, D. & SHISHEVA, A. 2006. Localized PtdIns 3,5-P₂ synthesis to regulate early endosome dynamics and fusion. *Am J Physiol Cell Physiol*, 291, C393-404.

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., CARSON, C. T., LAURENT, L. C., MARSALA, M., GAGE, F. H., REMES, A. M., KOO, E. H. & GOLDSTEIN, L. S. 2012. Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature*, 482, 216-20.

JEFFERIES, H. B., COOKE, F. T., JAT, P., BOUCHERON, C., KOIZUMI, T., HAYAKAWA, M., KAIZAWA, H., OHISHI, T., WORKMAN, P., WATERFIELD, M. D. & PARKER, P. J. 2008. A selective PIKfyve inhibitor blocks PtdIns(3,5)P₂ production and disrupts endomembrane transport and retroviral budding. *EMBO Rep*, 9, 164-70.

JIANG, Y., MULLANEY, K. A., PETERHOFF, C. M., CHE, S., SCHMIDT, S. D., BOYER-BOITEAU, A., GINSBERG, S. D., CATALDO, A. M., MATHEWS, P. M. & NIXON, R. A. 2010. Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 1630-5.

JOHNSON, D. E., OSTROWSKI, P., JAUMOUILLE, V. & GRINSTEIN, S. 2016. The position of lysosomes within the cell determines their luminal pH. *J Cell Biol*, 212, 677-92.

JOST, M., SIMPSON, F., KAVRAN, J. M., LEMMON, M. A. & SCHMID, S. L. 1998. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is required for endocytic coated vesicle formation. *Curr Biol*, 8, 1399-402.

KALAIIDZIDIS, I., MIACZYNSKA, M., BREWINSKA-OLCHOWIK, M., HUPALOWSKA, A., FERGUSON, C., PARTON, R. G., KALAIIDZIDIS, Y. & ZERIAL, M. 2015. APPL endosomes are not obligatory endocytic intermediates but act as stable cargo-sorting compartments. *J Cell Biol*, 211, 123-44.

KARCH, C. M. & GOATE, A. M. 2015. Alzheimer's disease risk genes and mechanisms of disease pathogenesis. *Biol Psychiatry*, 77, 43-51.

KIM, S., SATO, Y., MOHAN, P. S., PETERHOFF, C., PENSALFINI, A., RIGOGLIOSO, A., JIANG, Y. & NIXON, R. A. 2016. Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP-betaCTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*, 21, 707-16.

KIM, W. T., CHANG, S., DANIELL, L., CREMONA, O., DI PAOLO, G. & DE CAMILLI, P. 2002. Delayed reentry of recycling vesicles into the fusion-competent synaptic vesicle pool in synaptojanin 1 knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 17143-8.

KIMURA, R., YAMAMOTO, M., MORIHARA, T., AKATSU, H., KUDO, T., KAMINO, K. & TAKEDA, M. 2009. SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease in a Japanese population. *Neurosci Lett*, 461, 177-80.

KINOSHITA, A., FUKUMOTO, H., SHAH, T., WHELAN, C. M., IRIZARRY, M. C. & HYMAN, B. T. 2003. Demonstration by FRET of BACE interaction with the amyloid precursor protein at the cell surface and in early endosomes. *J Cell Sci*, 116, 3339-46.

KIROLA, L., BEHARI, M., SHISHIR, C. & THELMA, B. K. 2016. Identification of a novel homozygous mutation Arg459Pro in SYNJ1 gene of an Indian family with autosomal recessive juvenile Parkinsonism. *Parkinsonism Relat Disord*, 31, 124-128.

KLEIJMEER, M. J., MORKOWSKI, S., GRIFFITH, J. M., RUDENSKY, A. Y. & GEUZE, H. J. 1997. Major histocompatibility complex class II compartments in human and mouse B lymphoblasts represent conventional endocytic compartments. *J Cell Biol*, 139, 639-49.

KLUMPERMAN, J. & RAPOSO, G. 2014. The complex ultrastructure of the endolysosomal system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 6, a016857.

KOBAYASHI, T., BEUCHAT, M. H., CHEVALLIER, J., MAKINO, A., MAYRAN, N., ESCOLA, J. M., LEBRAND, C., COSSON, P., KOBAYASHI, T. & GRUENBERG, J. 2002. Separation and characterization of late endosomal membrane domains. *J Biol Chem*, 277, 32157-64.

KOBAYASHI, T., STANG, E., FANG, K. S., DE MOERLOOSE, P., PARTON, R. G. & GRUENBERG, J. 1998. A lipid associated with the antiphospholipid syndrome regulates endosome structure and function. *Nature*, 392, 193-7.

KOO, E. H. & SQUAZZO, S. L. 1994. Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem*, 269, 17386-9.

KREBS, C. E., KARKHEIRAN, S., POWELL, J. C., CAO, M., MAKAROV, V., DARVISH, H., DI PAOLO, G., WALKER, R. H., SHAHIDI, G. A., BUXBAUM, J. D., DE CAMILLI, P., YUE, Z. & PAISAN-RUIZ, C. 2013. The Sac1 domain of SYNJ1 identified mutated in a family with early-onset progressive Parkinsonism with generalized seizures. *Hum Mutat*, 34, 1200-7.

LAI, A., SISODIA, S. S. & TROWBRIDGE, I. S. 1995. Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem*, 270, 3565-73.

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., RUSSO, G., THORTON-WELLS, T. A., JONES, N., SMITH, A. V., CHOURAKI, V., THOMAS, C., IKRAM, M. A., ZELENKA, D., VARDARAJAN, B. N., KAMATANI, Y., LIN, C. F., GERRISH, A., SCHMIDT, H., KUNKLE, B., DUNSTAN, M. L., RUIZ, A., BIHOREAU, M. T., CHOI, S. H., REITZ, C., PASQUIER, F., CRUCHAGA, C., CRAIG, D., AMIN, N., BERR, C., LOPEZ, O. L., DE JAGER, P. L., DERAMECOURT, V., JOHNSTON, J. A., EVANS, D., LOVESTONE, S., LETENNEUR, L., MORON, F. J., RUBINSZTEIN, D. C., EIRIKSDOTTIR, G., SLEEGERS, K., GOATE, A. M., FIEVET, N., HUENTELMAN, M. W., GILL, M., BROWN, K., KAMBOH, M. I., KELLER, L., BARBERGER-GATEAU, P., MCGUINNESS, B., LARSON, E. B., GREEN, R., MYERS, A. J., DUFOUIL, C., TODD, S., WALLON, D., LOVE, S., ROGAEVA, E., GALLACHER, J., ST GEORGE-HYSLOP, P., CLARIMON, J., LLEO, A., BAYER, A., TSUANG, D. W., YU, L., TSOLAKI, M., BOSSU, P., SPALLETTA, G., PROITSI, P., COLLINGE, J., SORBI, S., SANCHEZ-GARCIA, F., FOX, N. C., HARDY, J., DENIZ NARANJO, M. C., BOSCO, P., CLARKE, R., BRAYNE, C., GALIMBERTI, D., MANCUSO, M., MATTHEWS, F., MOEBUS, S., MECOCCHI, P., DEL ZOMPO, M., MAIER, W., HAMPEL, H., PILOTTO, A., BULLIDO, M., PANZA, F., CAFFARRA, P., NACMIAS, B., GILBERT, J. R., MAYHAUS, M., LANNEFELT, L., HAKONARSON, H., PICHLER, S., et al. 2013. Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet*, 45, 1452-8.

LANGUI, D., GIRARDOT, N., EL HACHIMI, K. H., ALLINQUANT, B., BLANCHARD, V., PRADIER, L. & DUYCKAERTS, C. 2004. Subcellular topography of neuronal Abeta peptide in APPxPS1 transgenic mice. *Am J Pathol*, 165, 1465-77.

LAURITZEN, I., PARDOSSI-PIQUARD, R., BAUER, C., BRIGHAM, E., ABRAHAM, J. D., RANALDI, S., FRASER, P., ST-GEORGE-HYSLOP, P., LE THUC, O., ESPIN, V., CHAMI, L., DUNYS, J. & CHECLER, F. 2012. The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci*, 32, 16243-1655a.

LAURITZEN, I., PARDOSSI-PIQUARD, R., BOURGEOIS, A., PAGNOTTA, S., BIFERI, M. G., BARKATS, M., LACOR, P., KLEIN, W., BAUER, C. & CHECLER, F. 2016. Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol*, 132, 257-76.

LEE, J. H., MCBRAYER, M. K., WOLFE, D. M., HASLETT, L. J., KUMAR, A., SATO, Y., LIE, P. P., MOHAN, P., COFFEY, E. E., KOMPELLA, U., MITCHELL, C. H., LLOYD-EVANS, E. & NIXON, R. A. 2015. Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification. *Cell Rep*, 12, 1430-44.

LEE, J. H., YU, W. H., KUMAR, A., LEE, S., MOHAN, P. S., PETERHOFF, C. M., WOLFE, D. M., MARTINEZ-VICENTE, M., MASSEY, A. C., SOVAK, G., UCHIYAMA, Y., WESTAWAY, D., CUERVO, A. M. & NIXON, R. A. 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141, 1146-58.

LEJEUNE, J., GAUTIER, M. & TURPIN, R. 1959. [Study of somatic chromosomes from 9 mongoloid children]. *C R Hebd Seances Acad Sci*, 248, 1721-2.

LI, G., D'SOUZA-SCHOREY, C., BARBIERI, M. A., ROBERTS, R. L., KLIPPEL, A., WILLIAMS, L. T. & STAHL, P. D. 1995. Evidence for phosphatidylinositol 3-kinase as a regulator of endocytosis via activation of Rab5. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 10207-11.

LIPPE, R., MIACZYNSKA, M., RYBIN, V., RUNGE, A. & ZERIAL, M. 2001. Functional synergy between Rab5 effector Rabaptin-5 and exchange factor Rabex-5 when physically associated in a complex. *Mol Biol Cell*, 12, 2219-28.

LIU, T. T., GOMEZ, T. S., SACKKEY, B. K., BILLADEAU, D. D. & BURD, C. G. 2012. Rab GTPase regulation of retromer-mediated cargo export during endosome maturation. *Mol Biol Cell*, 23, 2505-15.

LOBINGIER, B. T., HUTTENHAIN, R., EICHEL, K., MILLER, K. B., TING, A. Y., VON ZASTROW, M. & KROGAN, N. J. 2017. An Approach to Spatiotemporally Resolve Protein Interaction Networks in Living Cells. *Cell*, 169, 350-360.e12.

LOTT, I. T. & HEAD, E. 2019. Dementia in Down syndrome: unique insights for Alzheimer disease research. *Nat Rev Neurol*.

MANI, M., LEE, S. Y., LUCAST, L., CREMONA, O., DI PAOLO, G., DE CAMILLI, P. & RYAN, T. A. 2007. The dual phosphatase activity of synaptojanin1 is required for both efficient synaptic vesicle endocytosis and reavailability at nerve terminals. *Neuron*, 56, 1004-18.

MARQUER, C., DEVAUGES, V., COSSEC, J. C., LIOT, G., LECART, S., SAUDOU, F., DUYCKAERTS, C., LEVEQUE-FORT, S. & POTIER, M. C. 2011. Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J*, 25, 1295-305.

MARQUER, C., LAINE, J., DAUPHINOT, L., HANBOUCH, L., LEMERCIER-NEUILLET, C., PIERROT, N., BOSSERS, K., LE, M., CORLIER, F., BENSTAALI, C., SAUDOU, F., THINAKARAN, G., CARTIER, N., OCTAVE, J. N., DUYCKAERTS, C. & POTIER, M. C. 2014. Increasing membrane cholesterol of neurons in culture recapitulates Alzheimer's disease early phenotypes. *Mol Neurodegener*, 9, 60.

MARTIN, N. P., MOHNEY, R. P., DUNN, S., DAS, M., SCAPPINI, E. & O'BRYAN, J. P. 2006. Intersectin regulates epidermal growth factor receptor endocytosis, ubiquitylation, and signaling. *Mol Pharmacol*, 70, 1643-53.

MARTIN, S. B., DOWLING, A. L., LIANEKHAMMY, J., LOTT, I. T., DORAN, E., MURPHY, M. P., BECKETT, T. L., SCHMITT, F. A. & HEAD, E. 2014. Synaptophysin and synaptojanin-1 in Down syndrome are differentially affected by Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 42, 767-75.

MCCARTNEY, A. J., ZHANG, Y. & WEISMAN, L. S. 2014. Phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate: low abundance, high significance. *Bioessays*, 36, 52-64.

MCGAVIN, M. K., BADOOR, K., HARDY, L. A., KUBISESKI, T. J., ZHANG, J. & SIMINOVITCH, K. A. 2001. The intersectin 2 adaptor links Wiskott Aldrich Syndrome protein (WASP)-mediated actin polymerization to T cell antigen receptor endocytosis. *J Exp Med*, 194, 1777-87.

MCINTIRE, L. B., BERMAN, D. E., MYAENG, J., STANISZEWSKI, A., ARANCIO, O., DI PAOLO, G. & KIM, T. W. 2012. Reduction of synaptojanin 1 ameliorates synaptic and behavioral impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 32, 15271-6.

MCPHERSON, P. S., GARCIA, E. P., SLEPNEV, V. I., DAVID, C., ZHANG, X., GRABS, D., SOSSIN, W. S., BAUERFEIND, R., NEMOTO, Y. & DE CAMILLI, P. 1996. A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature*, 379, 353-7.

MERRIFIELD, C. J., QUALMANN, B., KESSELS, M. M. & ALMERS, W. 2004. Neural Wiskott Aldrich Syndrome Protein (N-WASP) and the Arp2/3 complex are recruited to sites of clathrin-mediated endocytosis in cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol*, 83, 13-8.

MIACZYNSKA, M., CHRISTOFORIDIS, S., GINER, A., SHEVCHENKO, A., UTENWEILER-JOSEPH, S., HABERMANN, B., WILM, M., PARTON, R. G. & ZERIAL, M. 2004. APPL proteins link Rab5 to nuclear signal transduction via an endosomal compartment. *Cell*, 116, 445-56.

MILLER, C. C., MCLOUGHLIN, D. M., LAU, K. F., TENNANT, M. E. & ROGELJ, B. 2006. The X11 proteins, Abeta production and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*, 29, 280-5.

MIRANDA, A. M., HERMAN, M., CHENG, R., NAHMANI, E., BARRETT, G., MICEVSKA, E., FONTAINE, G., POTIER, M. C., HEAD, E., SCHMITT, F. A., LOTT, I. T., JIMENEZ-VELAZQUEZ, I. Z., ANTONARAKIS, S. E., DI PAOLO, G., LEE, J. H., HUSSAINI, S. A. & MARQUER, C. 2018. Excess Synaptojanin 1 Contributes to Place Cell Dysfunction and Memory Deficits in the Aging Hippocampus in Three Types of Alzheimer's Disease. *Cell Rep*, 23, 2967-2975.

MOREL, E., CHAMOUN, Z., LASIECKA, Z. M., CHAN, R. B., WILLIAMSON, R. L., VETANOVETZ, C., DALL'ARMI, C., SIMOES, S., POINT DU JOUR, K. S., MCCABE, B. D., SMALL, S. A. & DI PAOLO, G. 2013. Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nat Commun*, 4, 2250.

NEMOTO, Y., KEARNS, B. G., WENK, M. R., CHEN, H., MORI, K., ALB, J. G., JR., DE CAMILLI, P. & BANKAITIS, V. A. 2000. Functional characterization of a mammalian Sac1 and mutants exhibiting substrate-specific defects in phosphoinositide phosphatase activity. *J Biol Chem*, 275, 34293-305.

NETZER, W. J., POWELL, C., NONG, Y., BLUNDELL, J., WONG, L., DUFF, K., FLAJOLET, M. & GREENGARD, P. 2010. Lowering beta-amyloid levels rescues learning and memory in a Down syndrome mouse model. *PLoS One*, 5, e10943.

NIELSEN, E., CHRISTOFORIDIS, S., UTTENWEILER-JOSEPH, S., MIACZYNSKA, M., DEWITTE, F., WILM, M., HOFLACK, B. & ZERIAL, M. 2000. Rabenosyn-5, a novel Rab5 effector, is complexed with hVPS45 and recruited to endosomes through a FYVE finger domain. *J Cell Biol*, 151, 601-12.

NISHIKAWA, T., TAKAHASHI, T., NAKAMORI, M., YAMAZAKI, Y., KURASHIGE, T., NAGANO, Y., NISHIDA, Y., IZUMI, Y. & MATSUMOTO, M. 2014. Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate is enriched in granulovacuolar degeneration bodies and neurofibrillary tangles. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 40, 489-501.

NIXON, R. A. 2017. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *Faseb j*, 31, 2729-2743.

OKAMOTO, M., SCHOCH, S. & SUDHOF, T. C. 1999. EHS1/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, 18446-54.

OLGIATI, S., DE ROSA, A., QUADRI, M., CRISCUOLO, C., BREEDVELD, G. J., PICILLO, M., PAPPATA, S., QUARANTELLI, M., BARONE, P., DE MICHELE, G. & BONIFATI, V. 2014. PARK20 caused by SYNJ1 homozygous Arg258Gln mutation in a new Italian family. *Neurogenetics*, 15, 183-8.

PATKI, V., LAWE, D. C., CORVERA, S., VIRBASIOUS, J. V. & CHAWLA, A. 1998. A functional PtdIns(3)P-binding motif. *Nature*, 394, 433-4.

PECHSTEIN, A., BACETIC, J., VAHEDI-FARIDI, A., GROMOVA, K., SUNDBORGER, A., TOMLIN, N., KRAINER, G., VORONTSOVA, O., SCHAFFER, J. G., OWE, S. G., COUSIN, M. A., SAENGER, W., SHUPLIAKOV, O. & HAUCKE, V. 2010. Regulation of synaptic vesicle recycling by complex formation between intersectin 1 and the clathrin adaptor complex AP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 4206-11.

PEREZ, R. G., SORIANO, S., HAYES, J. D., OSTASZEWSKI, B., XIA, W., SELKOE, D. J., CHEN, X., STOKIN, G. B. & KOO, E. H. 1999. Mutagenesis identifies new signals for beta-amyloid precursor protein endocytosis, turnover, and the generation of secreted fragments, including Abeta42. *J Biol Chem*, 274, 18851-6.

PRASHER, V. P., FARRER, M. J., KESSLING, A. M., FISHER, E. M., WEST, R. J., BARBER, P. C. & BUTLER, A. C. 1998. Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome. *Ann Neurol*, 43, 380-3.

PREDESCU, S. A., PREDESCU, D. N., TIMBLIN, B. K., STAN, R. V. & MALIK, A. B. 2003. Intersectin regulates fission and internalization of caveolae in endothelial cells. *Mol Biol Cell*, 14, 4997-5010.

PUCHARCOS, C., FUENTES, J. J., CASAS, C., DE LA LUNA, S., ALCANTARA, S., ARBONES, M. L., SORIANO, E., ESTIVILL, X. & PRITCHARD, M. 1999. Alu-splice cloning of human Intersectin (ITSN), a putative multivalent binding protein expressed in proliferating and differentiating neurons and overexpressed in Down syndrome. *Eur J Hum Genet*, 7, 704-12.

QUADRI, M., FANG, M., PICILLO, M., OLGATI, S., BREEDVELD, G. J., GRAAFLAND, J., WU, B., XU, F., ERRO, R., AMBONI, M., PAPPATA, S., QUARANTELLI, M., ANNESI, G., QUATTRONE, A., CHIEN, H. F., BARBOSA, E. R., OOSTRA, B. A., BARONE, P., WANG, J. & BONIFATI, V. 2013. Mutation in the SYNJ1 gene associated with autosomal recessive, early-onset Parkinsonism. *Hum Mutat*, 34, 1208-15.

RAIBORG, C., BREMNES, B., MEHLUM, A., GILLOOLY, D. J., D'ARRIGO, A., STANG, E. & STENMARK, H. 2001. FYVE and coiled-coil domains determine the specific localisation of Hrs to early endosomes. *J Cell Sci*, 114, 2255-63.

RAJA, W. K., MUNGENAST, A. E., LIN, Y. T., KO, T., ABDURROB, F., SEO, J. & TSAI, L. H. 2016. Self-Organizing 3D Human Neural Tissue Derived from Induced Pluripotent Stem Cells Recapitulate Alzheimer's Disease Phenotypes. *PLoS One*, 11, e0161969.

RAMJAUN, A. R. & MCPHERSON, P. S. 1996. Tissue-specific alternative splicing generates two synaptotagmin isoforms with differential membrane binding properties. *J Biol Chem*, 271, 24856-61.

REEVES, R. H., IRVING, N. G., MORAN, T. H., WOHN, A., KITT, C., SISODIA, S. S., SCHMIDT, C., BRONSON, R. T. & DAVISSON, M. T. 1995. A mouse model for Down syndrome exhibits learning and behaviour deficits. *Nat Genet*, 11, 177-84.

RINK, J., GHIGO, E., KALAIIDZIDIS, Y. & ZERIAL, M. 2005. Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. *Cell*, 122, 735-49.

ROBERTS, R. L., BARBIERI, M. A., PRYSE, K. M., CHUA, M., MORISAKI, J. H. & STAHL, P. D. 1999. Endosome fusion in living cells overexpressing GFP-rab5. *J Cell Sci*, 112 (Pt 21), 3667-75.

ROGAJEVA, E., MENG, Y., LEE, J. H., GU, Y., KAWARAI, T., ZOU, F., KATAYAMA, T., BALDWIN, C. T., CHENG, R., HASEGAWA, H., CHEN, F., SHIBATA, N., LUNETTA, K. L., PARDOSSI-PIQUARD, R., BOHM, C., WAKUTANI, Y., CUPPLES, L. A., CUENCO, K. T., GREEN, R. C., PINESSI, L., RAINERO, I., SORBI, S., BRUNI, A., DUARA, R., FRIEDLAND, R. P., INZELBERG, R., HAMPE, W., BUJO, H., SONG, Y. Q., ANDERSEN, O. M., WILLNOW, T. E., GRAFF-RADFORD, N., PETERSEN, R. C., DICKSON, D., DER, S. D., FRASER, P. E., SCHMITT-ULMS, G., YOUNKIN, S., MAYEUX, R., FARRER, L. A. & ST GEORGE-HYSLOP, P. 2007. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet*, 39, 168-77.

ROJAS, R., VAN VLIJMEN, T., MARDONES, G. A., PRABHU, Y., ROJAS, A. L., MOHAMMED, S., HECK, A. J., RAPOSO, G., VAN DER SLUIJS, P. & BONIFACINO, J. S. 2008. Regulation of retromer recruitment to endosomes by sequential action of Rab5 and Rab7. *J Cell Biol*, 183, 513-26.

ROVELET-LECRUX, A., HANNEQUIN, D., RAUX, G., LE MEUR, N., LAQUERRIERE, A., VITAL, A., DUMANCHIN, C., FEUILLETTE, S., BRICE, A., VERCELLETTO, M., DUBAS, F., FREBOURG, T. & CAMPION, D. 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nat Genet*, 38, 24-6.

ROZELLE, A. L., MACHESKY, L. M., YAMAMOTO, M., DRIESSENS, M. H., INSALL, R. H., ROTH, M. G., LUBY-PHELPS, K., MARRIOTT, G., HALL, A. & YIN, H. L. 2000. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin-based movement of raft-enriched vesicles through WASP-Arp2/3. *Curr Biol*, 10, 311-20.

SALEHI, A., DELCROIX, J. D., BELICHENKO, P. V., ZHAN, K., WU, C., VALLETTA, J. S., TAKIMOTO-KIMURA, R., KLESCHCHNIKOV, A. M., SAMBAMURTI, K., CHUNG, P. P., XIA, W., VILLAR, A., CAMPBELL, W. A., KULNANE, L. S., NIXON, R. A., LAMB, B. T., EPSTEIN, C. J., STOKIN, G. B., GOLDSTEIN, L. S. & MOBLEY, W. C. 2006. Increased App expression in a mouse model of Down's syndrome disrupts NGF transport and causes cholinergic neuron degeneration. *Neuron*, 51, 29-42.

SBRISSA, D., IKONOMOV, O. C. & SHISHEVA, A. 2002. Phosphatidylinositol 3-phosphate-interacting domains in PIKfyve. Binding specificity and role in PIKfyve. Endomembrane localization. *J Biol Chem*, 277, 6073-9.

SCHINK, K. O., TAN, K. W. & STENMARK, H. 2016. Phosphoinositides in Control of Membrane Dynamics. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 32, 143-171.

SCHWAGERL, A. L., MOHAN, P. S., CATALDO, A. M., VONSATTEL, J. P., KOWALL, N. W. & NIXON, R. A. 1995. Elevated levels of the endosomal-lysosomal proteinase cathepsin D in cerebrospinal fluid in Alzheimer disease. *J Neurochem*, 64, 443-6.

SEALS, D. F., EITZEN, G., MARGOLIS, N., WICKNER, W. T. & PRICE, A. 2000. A Ypt/Rab effector complex containing the Sec1 homolog Vps33p is required for homotypic vacuole fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9402-7.

SEMERDJIEVA, S., SHORTT, B., MAXWELL, E., SINGH, S., FONAREV, P., HANSEN, J., SCHIAVO, G., GRANT, B. D. & SMYTHE, E. 2008. Coordinated regulation of AP2 uncoating from clathrin-coated vesicles by rab5 and hRME-6. *J Cell Biol*, 183, 499-511.

SEPULVEDA, F. E., MASCHALIDI, S., COLISSON, R., HESLOP, L., GHIRELLI, C., SAKKA, E., LENNON-DUMENIL, A. M., AMIGORENA, S., CABANIE, L. & MANOURY, B. 2009. Critical role for asparagine endopeptidase in endocytic Toll-like receptor signaling in dendritic cells. *Immunity*, 31, 737-48.

SHI, Y., KIRWAN, P., SMITH, J., MACLEAN, G., ORKIN, S. H. & LIVESEY, F. J. 2012. A human stem cell model of early Alzheimer's disease pathology in Down syndrome. *Sci Transl Med*, 4, 124ra29.

SHIN, H. W., HAYASHI, M., CHRISTOFORIDIS, S., LACAS-GERVAIS, S., HOEPFNER, S., WENK, M. R., MODREGGER, J., UTTENWEILER-JOSEPH, S., WILM, M., NYSTUEN, A., FRANKEL, W. N., SOLIMENA, M., DE CAMILLI, P. & ZERIAL, M. 2005. An enzymatic cascade of Rab5 effectors regulates phosphoinositide turnover in the endocytic pathway. *J Cell Biol*, 170, 607-18.

SINHA, S., ANDERSON, J. P., BARBOUR, R., BASI, G. S., CACCAVELLO, R., DAVIS, D., DOAN, M., DOVEY, H. F., FRIGON, N., HONG, J., JACOBSON-CROAK, K., JEWETT, N., KEIM, P., KNOPS, J., LIEBERBURG, I., POWER, M., TAN, H., TATSUNO, G., TUNG, J., SCHENK, D., SEUBERT, P., SUOMENSAARI, S. M., WANG, S., WALKER, D., ZHAO, J., MCCONLOGUE, L. & JOHN, V. 1999. Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain. *Nature*, 402, 537-40.

SISODIA, S. S. 1992. Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89, 6075-9.

SISODIA, S. S., KOO, E. H., BEYREUTHER, K., UNTERBECK, A. & PRICE, D. L. 1990. Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science*, 248, 492-5.

SISODIA, S. S., KOO, E. H., HOFFMAN, P. N., PERRY, G. & PRICE, D. L. 1993. Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci*, 13, 3136-42.

SLEEGERS, K., BROUWERS, N., GIJSELINCK, I., THEUNS, J., GOOSSENS, D., WAUTERS, J., DEL-FAVERO, J., CRUTS, M., VAN DUIJN, C. M. & VAN BROECKHOVEN, C. 2006. APP duplication is sufficient to cause early onset Alzheimer's dementia with cerebral amyloid angiopathy. *Brain*, 129, 2977-83.

SMALL, S. A., KENT, K., PIERCE, A., LEUNG, C., KANG, M. S., OKADA, H., HONIG, L., VONSATTEL, J. P. & KIM, T. W. 2005. Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*, 58, 909-19.

SMALL, S. A. & PETSKE, G. A. 2015. Retromer in Alzheimer disease, Parkinson disease and other neurological disorders. *Nat Rev Neurosci*, 16, 126-32.

SMALL, S. A., SIMOES-SPASSOV, S., MAYEUX, R. & PETSKE, G. A. 2017. Endosomal Traffic Jams Represent a Pathogenic Hub and Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci*, 40, 592-602.

SONNICHSEN, B., DE RENZIS, S., NIELSEN, E., RIETDORF, J. & ZERIAL, M. 2000. Distinct membrane domains on endosomes in the recycling pathway visualized by multicolor imaging of Rab4, Rab5, and Rab11. *J Cell Biol*, 149, 901-14.

STENMARK, H. 2009. Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 513-25.

STENMARK, H., AASLAND, R., TOH, B. H. & D'ARRIGO, A. 1996. Endosomal localization of the autoantigen EEA1 is mediated by a zinc-binding FYVE finger. *J Biol Chem*, 271, 24048-54.

STENMARK, H. & GILLOOLY, D. J. 2001. Intracellular trafficking and turnover of phosphatidylinositol 3-phosphate. *Semin Cell Dev Biol*, 12, 193-9.

STENMARK, H., PARTON, R. G., STEELE-MORTIMER, O., LUTCKE, A., GRUENBERG, J. & ZERIAL, M. 1994. Inhibition of rab5 GTPase activity stimulates membrane fusion in endocytosis. *Embo j*, 13, 1287-96.

STENMARK, H., VITALE, G., ULLRICH, O. & ZERIAL, M. 1995. Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion. *Cell*, 83, 423-32.

TAUNTON, J., ROWNING, B. A., COUGHLIN, M. L., WU, M., MOON, R. T., MITCHISON, T. J. & LARABELL, C. A. 2000. Actin-dependent propulsion of endosomes and lysosomes by recruitment of N-WASP. *J Cell Biol*, 148, 519-30.

TEMKIN, P., LAUFFER, B., JAGER, S., CIMERMANCIC, P., KROGAN, N. J. & VON ZASTROW, M. 2011. SNX27 mediates retromer tubule entry and endosome-to-plasma membrane trafficking of signalling receptors. *Nat Cell Biol*, 13, 715-21.

THOMAS, S., RITTER, B., VERBICH, D., SANSON, C., BOURBONNIERE, L., MCKINNEY, R. A. & MCPHERSON, P. S. 2009. Intersectin regulates dendritic spine development and somatodendritic endocytosis but not synaptic vesicle recycling in hippocampal neurons. *J Biol Chem*, 284, 12410-9.

TONG, X. K., HUSSAIN, N. K., DE HEUVEL, E., KURAKIN, A., ABI-JAOUDE, E., QUINN, C. C., OLSON, M. F., MARAIS, R., BARANES, D., KAY, B. K. & MCPHERSON, P. S. 2000. The endocytic protein intersectin is a major binding partner for the Ras exchange factor mSos1 in rat brain. *Embo j*, 19, 1263-71.

TOOZE, J. & HOLLINSHEAD, M. 1991. Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. *J Cell Biol*, 115, 635-53.

TORRES, M., JIMENEZ, S., SANCHEZ-VARO, R., NAVARRO, V., TRUJILLO-ESTRADA, L., SANCHEZ-MEJIAS, E., CARMONA, I., DAVILA, J. C., VIZUETE, M., GUTIERREZ, A. & VITORICA, J. 2012. Defective lysosomal proteolysis and axonal transport are early pathogenic events that worsen with age leading to increased APP metabolism and synaptic Abeta in transgenic APP/PS1 hippocampus. *Mol Neurodegener*, 7, 59.

ULLRICH, O., STENMARK, H., ALEXANDROV, K., HUBER, L. A., KAIBUCHI, K., SASAKI, T., TAKAI, Y. & ZERIAL, M. 1993. Rab GDP dissociation inhibitor as a general regulator for the membrane association of rab proteins. *J Biol Chem*, 268, 18143-50.

VANHOUWAERT, R., KUENEN, S., MASIUS, R., BADEMOSI, A., MANETSBERGER, J., SCHOOVAERTS, N., BOUNTI, L., GONTCHARENKO, S., SWERTS, J., VILAIN, S., PICILLO, M., BARONE, P., MUNSHI, S. T., DE VRIJ, F. M., KUSHNER, S. A., GOUNKO, N. V., MANDEMAKERS, W., BONIFATI, V., MEUNIER, F. A., SOUKUP, S. F. & VERSTREKEN, P. 2017. The SAC1 domain in synaptojanin is required for autophagosome maturation at presynaptic terminals. *Embo j*, 36, 1392-1411.

VARDARAJAN, B. N., BRUESEGEM, S. Y., HARBOUR, M. E., INZELBERG, R., FRIEDLAND, R., ST GEORGE-HYSLOP, P., SEAMAN, M. N. & FARRER, L. A. 2012. Identification of Alzheimer disease-associated variants in genes that regulate retromer function. *Neurobiol Aging*, 33, 2231.e15-2231.e30.

VASSAR, R., BENNETT, B. D., BABU-KHAN, S., KAHN, S., MENDIAZ, E. A., DENIS, P., TEPLow, D. B., ROSS, S., AMARANTE, P., LOELOFF, R., LUO, Y., FISHER, S., FULLER, J., EDENSON, S., LILE, J., JAROSINSKI, M. A., BIERE, A. L., CURRAN, E., BURGESS, T., LOUIS, J. C., COLLINS, F., TREANOR, J., ROGERS, G. & CITRON, M. 1999. Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science*, 286, 735-41.

VETRIVEL, K. S., MECKLER, X., CHEN, Y., NGUYEN, P. D., SEIDAH, N. G., VASSAR, R., WONG, P. C., FUKATA, M., KOUNNAS, M. Z. & THINAKARAN, G. 2009. Alzheimer disease Abeta production in the absence of S-palmitoylation-dependent targeting of BACE1 to lipid rafts. *J Biol Chem*, 284, 3793-803.

VIEIRA, S. I., REBELO, S., ESSELMANN, H., WILTFANG, J., LAH, J., LANE, R., SMALL, S. A., GANDY, S., DA CRUZ, E. S. E. F. & DA CRUZ, E. S. O. A. 2010. Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated. *Mol Neurodegener*, 5, 40.

VORONOV, S. V., FRERE, S. G., GIOVEDI, S., POLLINA, E. A., BOREL, C., ZHANG, H., SCHMIDT, C., AKESON, E. C., WENK, M. R., CIMASONI, L., ARANCIO, O., DAVISSON, M. T., ANTONARAKIS, S. E., GARDINER, K., DE CAMILLI, P. & DI PAOLO, G. 2008. Synaptojanin 1-linked phosphoinositide dyshomeostasis and cognitive deficits in mouse models of Down's syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 9415-20.

WANG, J., FEDOSEIENKO, A., CHEN, B., BURSTEIN, E., JIA, D. & BILLADEAU, D. D. 2018. Endosomal receptor trafficking: Retromer and beyond. *Traffic*, 19, 578-590.

WANG, X., HUANG, T., ZHAO, Y., ZHENG, Q., THOMPSON, R. C., BU, G., ZHANG, Y. W., HONG, W. & XU, H. 2014. Sorting nexin 27 regulates Abeta production through modulating gamma-secretase activity. *Cell Rep*, 9, 1023-33.

WANG, X., ZHAO, Y., ZHANG, X., BADIE, H., ZHOU, Y., MU, Y., LOO, L. S., CAI, L., THOMPSON, R. C., YANG, B., CHEN, Y., JOHNSON, P. F., WU, C., BU, G., MOBLEY, W. C., ZHANG, D., GAGE, F. H., RANSCHT, B., ZHANG, Y. W., LIPTON, S. A., HONG, W. & XU, H. 2013. Loss of sorting nexin 27 contributes to excitatory synaptic dysfunction by modulating glutamate receptor recycling in Down's syndrome. *Nat Med*, 19, 473-80.

WAUGH, M. G. 2015. PIPs in neurological diseases. *Biochim Biophys Acta*, 1851, 1066-82.

WEGNER, C. S., MALEROD, L., PEDERSEN, N. M., PROGIDA, C., BAKKE, O., STENMARK, H. & BRECH, A. 2010. Ultrastructural characterization of giant endosomes induced by GTPase-deficient Rab5. *Histochem Cell Biol*, 133, 41-55.

WEICK, J. P., HELD, D. L., BONADURER, G. F., 3RD, DOERS, M. E., LIU, Y., MAGUIRE, C., CLARK, A., KNACKERT, J. A., MOLINAROLO, K., MUSSER, M., YAO, L., YIN, Y., LU, J., ZHANG, X., ZHANG, S. C. & BHATTACHARYYA, A. 2013. Deficits in human trisomy 21 iPSCs and neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110, 9962-7.

WILMOT, B., MCWEENEY, S. K., NIXON, R. R., MONTINE, T. J., LAUT, J., HARRINGTON, C. A., KAYE, J. A. & KRAMER, P. L. 2008. Translational gene mapping of cognitive decline. *Neurobiol Aging*, 29, 524-41.

WISEMAN, F. K., AL-JANABI, T., HARDY, J., KARMILOFF-SMITH, A., NIZETIC, D., TYBULEWICZ, V. L., FISHER, E. M. & STRYDOM, A. 2015. A genetic cause of Alzheimer disease: mechanistic insights from Down syndrome. *Nat Rev Neurosci*, 16, 564-74.

WISEMAN, F. K., PULFORD, L. J., BARKUS, C., LIAO, F., PORTELIUS, E., WEBB, R., CHAVEZ-GUTIERREZ, L., CLEVERLEY, K., NOY, S., SHEPPARD, O., COLLINS, T., POWELL, C., SARELL, C. J., RICKMAN, M., CHOONG, X., TOSH, J. L., SIGANPORIA, C., WHITTAKER, H. T., STEWART, F., SZARUGA, M., MURPHY, M. P., BLENNOW, K., DE STROOPER, B., ZETTERBERG, H., BANNERMAN, D., HOLTZMAN, D. M., TYBULEWICZ, V. L. J. & FISHER, E. M. C. 2018. Trisomy of human chromosome 21 enhances amyloid-beta deposition independently of an extra copy of APP. *Brain*.

WOLLERT, T. & HURLEY, J. H. 2010. Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464, 864-9.

WOLLERT, T., WUNDER, C., LIPPINCOTT-SCHWARTZ, J. & HURLEY, J. H. 2009. Membrane scission by the ESCRT-III complex. *Nature*, 458, 172-7.

XU, W., WEISSMILLER, A. M., WHITE, J. A., 2ND, FANG, F., WANG, X., WU, Y., PEARN, M. L., ZHAO, X., SAWA, M., CHEN, S., GUNAWARDENA, S., DING, J., MOBLEY, W. C. & WU, C. 2016. Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration. *J Clin Invest*, 126, 1815-33.

YU, T., LI, Z., JIA, Z., CLAPCOTE, S. J., LIU, C., LI, S., ASRAR, S., PAO, A., CHEN, R., FAN, N., CARATTINI-RIVERA, S., BECHARD, A. R., SPRING, S., HENKELMAN, R. M., STOICA, G., MATSUI, S., NOWAK, N. J., RODER, J. C., CHEN, C., BRADLEY, A. & YU, Y. E. 2010. A mouse model of Down syndrome trisomic for all human chromosome 21 syntenic regions. *Hum Mol Genet*, 19, 2780-91.

YU, Y., CHU, P. Y., BOWSER, D. N., KEATING, D. J., DUBACH, D., HARPER, I., TKALCEVIC, J., FINKELSTEIN, D. I. & PRITCHARD, M. A. 2008. Mice deficient for the chromosome 21 ortholog *Itsn1* exhibit vesicle-trafficking abnormalities. *Hum Mol Genet*, 17, 3281-90.

ZEIGERER, A., GILLERON, J., BOGORAD, R. L., MARSICO, G., NONAKA, H., SEIFERT, S., EPSTEIN-BARASH, H., KUCHIMANCHI, S., PENG, C. G., RUDA, V. M., DEL CONTE-ZERIAL,

P., HENGSTLER, J. G., KALAIIDZIDIS, Y., KOTELIANSKY, V. & ZERIAL, M. 2012. Rab5 is necessary for the biogenesis of the endolysosomal system in vivo. *Nature*, 485, 465-70.

ZHU, L., ZHONG, M., ELDER, G. A., SANO, M., HOLTZMAN, D. M., GANDY, S., CARDOZO, C., HAROUTUNIAN, V., ROBAKIS, N. K. & CAI, D. 2015. Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112, 11965-70.

ZHU, L., ZHONG, M., ZHAO, J., RHEE, H., CAESAR, I., KNIGHT, E. M., VOLPICELLI-DALEY, L., BUSTOS, V., NETZER, W., LIU, L., LUCAST, L., EHRLICH, M. E., ROBAKIS, N. K., GANDY, S. E. & CAI, D. 2013. Reduction of synaptojanin 1 accelerates Abeta clearance and attenuates cognitive deterioration in an Alzheimer mouse model. *J Biol Chem*, 288, 32050-63.

ZONCU, R., PERERA, R. M., BALKIN, D. M., PIRRUCCELLO, M., TOOMRE, D. & DE CAMILLI, P. 2009. A phosphoinositide switch controls the maturation and signaling properties of APPL endosomes. *Cell*, 136, 1110-21.