



HAL
open science

Les APP-CTFs au cœur du processus pathologique de la maladie d'Alzheimer : contribution du système lysosomal-autophagique et de la sécrétion exosomale

Anaïs Bécot

► To cite this version:

Anaïs Bécot. Les APP-CTFs au cœur du processus pathologique de la maladie d'Alzheimer : contribution du système lysosomal-autophagique et de la sécrétion exosomale. Pharmacologie. COMUE Université Côte d'Azur (2015 - 2019), 2019. Français. NNT : 2019AZUR6039 . tel-03078927

HAL Id: tel-03078927

<https://theses.hal.science/tel-03078927>

Submitted on 17 Dec 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

Les APP-CTFs au cœur du processus
pathologique de la maladie d'Alzheimer :
contribution du système lysosomal-
autophagique et de la sécrétion exosomale

Anaïs BÉCOT

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, IPMC

Présentée en vue de l'obtention
du grade de docteur en
Sciences de la Vie et de la Santé
d'**Université Côte d'Azur**

Dirigée par : **Dr Frédéric Checler**

Soutenue le : **16 décembre 2019**

Devant le jury, composé de :

Dr Marie-Claude Potier, Présidente, ICM, Paris
Dr Frédéric Checler, Directeur de thèse, IMPC,
Sophia-Antipolis

Dr Benjamin Dehay, Rapporteur, IMN, Bordeaux
Dr Guillaume van Niel, Rapporteur, IPNP, Paris
Dr Kévin Baranger, Examineur, INP, Marseille
Dr Inger Lauritzen, Examinatrice, IPMC, Sophia-
Antipolis

LES APP-CTFs au cœur du processus pathologique de la maladie d'Alzheimer : contribution du système lysosomal-autophagique et de la sécrétion exosomale

Jury

Présidente du jury :

Dr Marie-Claude Potier, Directeur de Recherche, ICM, Paris

Rapporteurs :

Dr Guillaume van Niel, Directeur de Recherche, IPNP, Paris

Dr Benjamin Dehay, Chargé de Recherche, IMN, Bordeaux

Examineurs/trices :

Dr Kévin Baranger, Chargé de Recherche, INP, Marseille

Dr Inger Lauritzen, Ingénieure de Recherche, IPMC, Sophia-Antipolis

Dr Marie-Claude Potier, Directeur de Recherche, ICM, Paris

Directeur de thèse :

Dr Frédéric Checler, Directeur de recherche, IMPC, Sophia-Antipolis

Résumé scientifique

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par l'accumulation dans le cerveau d'agrégats extracellulaires et intraneuronaux ($A\beta$ et Tau, respectivement). Dans la cellule, la principale voie de dégradation des protéines agrégées est la voie lysosomale-autophagique, qui est altérée de façon précoce chez les patients Alzheimer. Des études récentes de mon laboratoire ont montré que ce dysfonctionnement lysosomal-autophagique serait à la fois la cause et la conséquence de l'accumulation du précurseur direct de l' $A\beta$, appelé C99 ou APP-CTF β . De par sa toxicité à plusieurs niveaux, le C99 semble donc jouer un rôle crucial dans l'étiologie de la maladie. Son accumulation se produit majoritairement dans les compartiments endolysosomaux mais de façon intéressante, un marquage extracellulaire associé au C99 a également été observé à des stades plus avancés de la maladie ou en présence d'un inhibiteur de la γ -sécrétase (enzyme clivant le C99 en $A\beta$).

Le premier axe de mon travail de thèse a donc consisté à étudier l'efficacité d'une activation du système lysosomal-autophagique sur l'accumulation du C99. Dans ce but, nous avons utilisé une stratégie virale visant à exprimer le facteur de transcription EB (TFEB) dans un modèle murin de la MA (3xTg-AD). Ce facteur est le principal régulateur de la biogenèse lysosomale et de l'autophagie. Deux approches ont été testées cherchant à exprimer le TFEB avant ou après le début de l'accumulation du C99, grâce à une injection de virus exprimant le TFEB, soit en intracérébroventriculaire dès la naissance, soit par stéréotaxie à l'âge de 3 mois. Ces études ont montré une réduction importante de l'accumulation intraneuronale du C99 chez les souris 3xTg-AD, que ce soit *via* l'approche "préventive" ou "curative".

Le deuxième axe de mon travail de thèse a cherché à comprendre l'origine du marquage extracellulaire observé dans le cerveau des souris Alzheimerisées et associé au C99. Nous avons émis l'hypothèse que ce marquage correspondrait à des exosomes enrichis en C99. Les exosomes sont des vésicules extracellulaires, d'origine endosomale et sécrétées par les cellules, ayant déjà été décrites comme transportant des protéines neurotoxiques. Grâce à des approches pharmacologiques, immunocytochimiques et génétiques, nous avons confirmé cette hypothèse et mis en évidence la présence de C99 et de son dérivé le C83 (APP-CTF α), dans les exosomes purifiés à partir de modèles cellulaires ou murins de la MA, sous forme monomérique et oligomérique. Nos travaux montrent également que la charge des exosomes en oligomères est fortement amplifiée en présence d'une inhibition de la γ -sécrétase, expliquant ainsi le marquage extracellulaire.

En conclusion, mes travaux de thèse (1) proposent une potentielle stratégie thérapeutique pour la MA, basée sur l'activation du TFEB et visant à empêcher l'accumulation du C99, (2) montrent la présence de monomères et d'oligomères de C99 dans les exosomes ainsi qu'un lien entre la γ -sécrétase et cette oligomérisation. Les futures études devront déterminer le rôle exact de ces exosomes enrichis en C99.

Mots clés maladie d'Alzheimer, C99, facteur de transcription EB, exosomes, oligomérisation

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is characterized by the pathological accumulation of extracellular and intracellular aggregates ($A\beta$ peptide and hyperphosphorylated Tau protein, respectively) in the brain. AD is also associated with an early alteration of the major degradation pathway of aggregated proteins, the autophagic-lysosomal pathway. Recent works have suggested that this defect could both be a cause and a consequence of early intraneuronal accumulation of C99 (also named as APP-CTF β), the direct precursor of $A\beta$. Due to its toxicity, C99 could be a possible key player of AD etiology. The accumulation of this product occurs mainly within organelles of the endolysosomal network, but our recent observations also indicate an extracellular accumulation of C99 in later stages of the disease, or in conditions where the $A\beta$ -generating enzyme, γ -secretase, is blocked.

The first aim of my PhD project was to investigate the possible beneficial effect of activating lysosomal-autophagic function on C99 accumulation. To this end, we used a viral strategy to overexpress TFEB, a master regulator of both lysosome biogenesis and autophagy, in a mouse model of AD (3xTg-AD mouse). Two approaches were tested aiming to express TFEB either before or after the beginning of C99 accumulation, by injecting AAV-TFEBs into the ventricles of newborn mice or by stereotaxic injection into 3 month-old mice, respectively. These studies have shown a strong TFEB-mediated reduction of C99 accumulation when using both the preventive and curative approach.

The aim of the second part of my PhD work was to understand the reasons of the extracellular accumulation of C99 in AD mouse brain. We postulated that this C99-associated immunostaining could correspond to exosomal-associated C99. Exosomes are nano-sized vesicles of endocytic origin that are released from cells and known to transport neurotoxic proteins. In our study based on pharmacological, immunocytochemical and genetic approaches, we have confirmed this hypothesis and have shown the presence of C99, and of its direct derived-fragment C83 (APP-CTF α), existing as both monomers and oligomers, in exosomes purified from AD cell and mouse models. Moreover, our data have shown that the levels of these APP-CTFs are strongly increased by γ -secretase inhibition, thus explaining the higher levels of extracellular staining in γ -secretase treated animals.

In conclusion, my PhD work shows 1) a new potential therapeutic strategy for AD, based on TFEB activation aiming to reduce early C99 accumulation and 2) the presence of monomeric and oligomeric C99 in exosomes in AD models and a link between γ -secretase inhibition and oligomerisation. Future studies are needed to elucidate the exact role of these C99-enriched exosomes in AD.

Keywords Alzheimer's disease, C99, transcription factor EB, exosomes, oligomerisation

Résumé vulgarisé

La maladie d'Alzheimer est aujourd'hui la première cause de démence dans le monde et se caractérise par l'accumulation anormale de protéines dans le cerveau, conduisant à la mort des neurones (neurodégénérescence). Malgré les symptômes handicapants pour la vie quotidienne du patient et de son entourage, il n'existe toujours pas de traitement curatif et les médicaments actuels sont peu efficaces. Ce manque d'efficacité s'explique notamment par un diagnostic trop tardif, les dégâts cérébraux étant alors déjà trop importants et les traitements inopérants.

Dans un premier temps, le but de mes travaux de thèse a été de montrer, qu'en intervenant le plus tôt possible, nous sommes capables de réduire l'accumulation d'une des protéines toxiques dans la maladie d'Alzheimer, appelée le C99. Plus précisément, l'accumulation de cette protéine dans les neurones des patients Alzheimer est causée par un défaut de sa dégradation par le système éboueur de la cellule, connu sous le nom de système lysosomal-autophagique ou autophagie ("se manger soi-même" en latin). Ce système est finement contrôlé dans la cellule par un facteur de transcription, appelé TFEB. Plus précisément, le rôle de ce TFEB est d'induire l'expression d'un grand nombre de protéines lysosomales et autophagiques. Notre idée a donc été d'augmenter l'expression de ce facteur chez des souris Alzheimerisées et d'étudier les effets sur l'accumulation du C99. Cette stratégie s'est révélée très prometteuse, induisant une forte diminution du C99 dans le cerveau des souris. L'intérêt maintenant est de trouver une molécule pouvant être utilisée chez l'Homme et capable d'activer le TFEB, dans le but d'éliminer le C99 toxique.

Dans un deuxième temps, l'objectif de mes travaux de thèse a été de déterminer si la protéine C99 pouvait également servir de marqueur pour le diagnostic précoce de la maladie d'Alzheimer. De façon intéressante, mes résultats ont montré que le C99 est présent à l'intérieur des neurones mais aussi dans des vésicules sécrétées en extracellulaire, appelées exosomes. De cette façon, le C99 est retrouvé dans le liquide céphalorachidien, dans lequel baigne le cerveau et obtenu par ponction lombaire chez les patients. Cela signifie que la protéine C99 pourrait être détectée en laboratoire d'analyses et potentiellement constituer un nouveau biomarqueur de la maladie. De plus, mes travaux ont permis de comprendre les mécanismes pathologiques à l'origine de la présence du C99 dans les exosomes, pouvant ainsi révéler une autre stratégie pour le cibler.

En résumé, mon travail de thèse contribue à faire progresser la recherche sur la maladie d'Alzheimer, en proposant d'une part, une nouvelle stratégie thérapeutique pour cibler une protéine toxique dans la maladie d'Alzheimer, et d'autre part, un potentiel biomarqueur pour le diagnostic précoce chez les patients.

Mots clés maladie d'Alzheimer, protéine toxique, C99, système de dégradation, TFEB, biomarqueur, exosomes

” *C’est qu’en vérité le chemin importe peu, la
volonté d’arriver suffit à tout.*

— **Albert Camus**
Le Mythe de Sisyphe

Liste des publications

Revue

I. Lauritzen, R. Pardossi-Piquard, A. Bourgeois, **A. Bécot** and F. Checler

Does Intraneuronal Accumulation Of Carboxyl-Terminal Fragments Of The Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease ?

Current Alzheimer Research, 2019, Vol 16, n°5, 453-457

Papiers

Article sous presse (accepté)

Inger Lauritzen*, **Anaïs Bécot***, Alexandre Bourgeois, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Maria-Grazia Biferi, Martine Barkats and Frédéric Checler

Targeting γ -secretase Triggers The Selective Enrichment Of Oligomeric APP-CTFs In Brain Extracellular Vesicles From Alzheimer Cell And Mouse Models

Translational Neurodegeneration

Article en préparation

Anaïs Bécot, Inger Lauritzen, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Alexandre Bourgeois and Frédéric Chercler

Overexpression Of The Transcription Factor EB Reduces The Intraneuronal Accumulation Of The β -secretase Derived APP Fragment C99 In Alzheimer's Disease Cellular And Mouse Models

Liste des présentations orales

Congrès scientifiques

- **AD/PD 2019, The 14th International Conference On Alzheimers' & Parkinson's Diseases**
Présentation d'un poster : *Enrichment Of C99 In Exosomes Derived From Cellular And Animal AD Models* – Mars 2019, Lisbonne
- **Congrès Francophone de l'Autophagie (CFATG), 7^{ème} édition**
Présentation d'un poster : *Autophagic Failure Induced By APP- β CTF In Animal Alzheimer Disease Model* – Novembre 2017, Paris

Présentations scientifiques internes

- **Journées de l'Ecole Doctorale de Nice (JEDN) 2019**
Présentation orale : *Enrichment Of Oligomeric APP-CTFs In Brain Exosomes From Alzheimer Disease Mouse Models* – Mai 2019, Nice
- **Retraite Scientifique IPMC 2018**
Présentation orale : *Modulation Of The Lysosomal-Autophagic Pathway In Alzheimer's Disease : A New Therapeutic Strategy?* – 1 présentation par équipe – Septembre 2018, Roquebrune sur Argens
- **Doc-Post Doc Meeting**
Présentation orale : *Modulation Of The Lysosomal-Autophagic Pathway In Alzheimer's Disease : A New Therapeutic Strategy?* – Mai 2018, IPMC
- **Journées de l'Ecole Doctorale de Nice (JEDN) 2018**
Présentation d'un poster : *Role Of Transcription Factor EB In Preventing C99 Accumulation In Alzheimer's Disease* – Mai 2018, Nice

Vulgarisation

- **Pint Of Science (PoS) 2019**

Présentation orale : *La maladie d'Alzheimer : quels outils pour la combattre ?* – Mai 2019, Nice

- **Fête de la science 2018**

Présentation orale : *Les neurones au microscope* – Septembre 2018, Antibes

- **Pint Of Science (PoS) 2018**

Présentation orale : *La maladie d'Alzheimer* – Mai 2018, Nice

- **La semaine du cerveau 2018**

Présentation orale : *La maladie d'Alzheimer : bientôt un mauvais souvenir ? Traitements, diagnostic et prévention* – Mars 2018, Valbonne

- **Retour d'expérience à l'IUT de La Rochelle**

Présentation orale : *Pourquoi et comment j'en suis venue à travailler sur la maladie d'Alzheimer ?* – Mars 2017, La Rochelle

Remerciements

Chaque doctorant(e) sait que la thèse a sa part de mélodrames et de stress (parfois post-traumatique aussi). Mais, ce que je retiens avant tout, c'est que la thèse est une aventure extraordinaire, riche en expériences scientifiques et surtout personnelles, riche en rencontres professionnelles et surtout personnelles et riche en partage, en blagues et en fous rires. À travers ces quelques lignes, je tiens donc à remercier toutes les personnes qui ont contribué à ce que cette aventure soit unique et qui feront que cette aventure sera inoubliable pour moi (même si la maladie d'Alzheimer me rattrape) !

Dans un premier temps, je tiens à remercier chacun des membres du jury, **Dr Benjamin Dehay**, **Dr Guillaume van Niel**, **Dr Marie-Claude Potier** et **Dr Kévin Baranger**, d'avoir accepté de juger mes travaux de thèse et de partager leur expertise scientifique. Ce fut une réelle chance pour moi d'avoir un jury aussi spécialisé, ouvert et sympathique.

Je tiens ensuite à remercier **Frédéric Checler** de m'avoir accueillie au sein de son équipe, d'abord en tant que stagiaire puis en tant que doctorante. Je vous remercie de m'avoir offert un environnement aussi stimulant et de qualité, pour vos conseils avisés et la liberté que vous m'avez laissée pendant ces 3 années de thèse.

Je tiens de toute évidence à remercier **Inger Lauritzen**, qui m'a encadrée et soutenue tout le long de ma thèse. Inger, je te remercie chaleureusement de m'avoir si bien formée en stage ainsi que pour ton encadrement bienveillant pendant ces 3 années de thèse, pour ta disponibilité au quotidien, pour ton optimisme sans faille, pour ta confiance réconfortante, pour tes remarques toujours constructives, pour ta bonne humeur communicative, pour tes encouragements et ton soutien malgré les (nombreux) aléas du direct... Tout cela m'a permis de gagner en maturité et d'être aujourd'hui très fière de ma thèse ! Je te serai toujours extrêmement reconnaissante pour tout ce partage scientifique et humain. C'était une chance incroyable de travailler avec une personne aussi passionnée et entière, nos discussions vont beaucoup me manquer !

Je tiens aussi à remercier l'ensemble de l'équipe FC, les permanents et les personnes de passage, qui ont contribué à ce que cette thèse soit une aventure très enrichissante et très conviviale pour moi. Je vous remercie tous pour le partage de votre expertise, pour vos conseils et votre bonne humeur !

Raphaëlle, un grand merci pour ton aide précieuse pour les injections et nos conversations en zone A2. C'était un plaisir de travailler avec quelqu'un d'aussi attentionnée.

Alexandre, merci pour le partage de ton savoir-faire en biologie moléculaire et les semaines passées en salle virus.

Charlotte, merci pour ton aide au quotidien, que ce soit pour les commandes ou la gestion de l'animalerie.

Mounia, merci pour nos conversations scientifiques et plus personnelles sur le trajet Nice-Sophia. J'ai beaucoup apprécié ta franchise et ton expertise scientifique de qualité.

Éric, merci pour toutes nos conversations sur la Science, c'était très agréable de discuter avec quelqu'un d'aussi passionné et professionnel.

Bureau D18, merci à chacun(e) pour tous les bons moments que nous avons passés ensemble : les renauderies de **Renaud**, la relève avec **Arnaud**, les petites blagues de **Loan**, la zenitude de **Seb**, les pauses café avec **Héloïse et Mélanie**, la douceur et le tempo de **Paula**.

Loan et Renaud, un merci de plus pour avoir accepté de me suivre dans l'aventure Pint of Science, c'était un beau moment de partage.

Audrey, merci pour ton naturel, ta générosité, ta joie de vivre et tous les moments passés ensemble (au labo et en dehors).

Lila, merci pour toutes nos conversations à refaire le monde, pour ton soutien, ta bonne humeur et les nombreux apéros.

Ligia, merci d'avoir apporté un peu de joie brésilienne dans l'équipe et pour tous les beaux moments partagés.

Paula, merci pour ta simplicité et ton partage, je suis très heureuse de t'avoir rencontré même si c'était sur la fin.

Kitima, merci pour ton séjour en France et les moments plus personnels passés en ta compagnie. Tu es une très belle personne ! J'espère pouvoir venir te voir en Thaïlande un jour.

Sandy (mais qu'est-ce qu'elle fait dans cette rubrique ?), merci pour ta folitude, ton amour et tous les moments fous passés ensemble. Ta présence et ton amitié a été d'un grand soutien pour moi (c'est comme si tu étais une FC pour moi).

Merci à toutes les autres personnes de l'équipe qui ont aussi participé à mon bien être au laboratoire et avec qui j'ai partagé de beaux souvenirs : **Aurore, Juliette, Fanny, Elissa, Julie, Wejdane, Cristine, Céline, Élodie et Corinne.**

Je tiens à remercier également mon équipe de substitution qui m'a été d'une aide chaleureuse pendant l'écriture de mon manuscrit. Merci **Sandra, Katharina, Sylvain, Maria et Marta** pour votre soutien si précieux.

Je tiens à remercier sincèrement l'ensemble des personnes en charge des plateformes à l'IPMC, qui m'ont formée, conseillée et aidée dans mes travaux de thèse. Je pense notamment à **Sophie et Frédéric** pour la microscopie confocale, à **Thomas, Alain, Véro, Lucien et Nicolas** pour la gestion de l'animalerie, **Nathalie** pour le séquençage, **Lucille** pour la lipidomique, **Catherine** pour l'hygiène/sécurité et les virus ainsi que **Franck** pour l'infographisme.

Je tiens à remercier toutes les personnes de l'institut avec qui j'ai partagé des moments de vie scientifiques et/ou personnels, une conversation dans le couloir, un café au soleil, une journée en stéréotaxie, un évènement de vulgarisation, une soirée dans un bar. Je pense notamment à **Malika, Lamyaa, Vanessa, Ana Rita, Paula, Loïc, Renan, Thomas, Sebastian, Jacques, Alaeddine, Ahmed, Jorris, Guillaume, Gwenola, Carole...**

Je tiens à remercier les personnes qui m'ont donné envie de faire de la recherche, je pense notamment à **Lourdes Moreno Amador, Valérie Verhasselt et bien sûr Inger**, qui restera un modèle pour moi.

Je tiens aussi à remercier les personnes qui ont participé à ces 3 années de thèse de façon beaucoup plus passive, scientifiquement parlant, mais de façon très active pour mon moral ! Je pense amicalement à **Kévin, Florence, Vincent, Michal, Loïc, Vincent et Delphine, Clément, Marie-France, Florent, François, JB et Marie, Julie et François...**

Je tiens à remercier également mes amis de plus longue date, qui m'ont toujours soutenue et m'ont permise de m'évader quelques semaines pendant ces 3 années de thèse (voyages, mariage, Messery...) Je pense très tendrement à **Marie, Kévin, Maïa, Xavier, Sandy et à tous les Cactus !** Ça pique d'amitié et de soutien, merci.

Enfin, je ne remercierai jamais assez mes proches pour leur soutien et leur amour au quotidien !

Papa, Maman, merci d'avoir toujours été là pour moi, pour votre soutien toutes ces années, pour mes études à l'autre bout de la France, pour avoir partagé quelques moments avec nous à Nice et pour tous les autres !

Léa, ma petite sœur d'Amour et demie-jumelle (d'après les dires), merci d'avoir partagé pendant 2 semaines la vie du labo avec moi ainsi que la vie carnavalesque, merci pour ton soutien inconditionnel, pour les moments de partage et de rire ensemble et bonne chance à toi dans la Biologie aussi ;)

Papi et la famille Bécot, merci pour tous vos mots de soutien et d'amour. J'ai bien sûr, une tendre pensée pour toi **Mamie** car si je suis aussi forte aujourd'hui, c'est aussi grâce à toi !

Martine et Éric, Romain et Louis, et les mamies, merci de m'avoir aussi bien accueillie dans votre famille, pour votre soutien et les moments partagés avec vous. Et le meilleur pour la fin : merci **Simon** tout d'abord pour ton aide précieuse en Python, en \LaTeX et en assemblage de PDF. Mais surtout je te remercie du fond du coeur pour ton soutien au quotidien pendant ces 3 années de thèse, pour tes conseils, pour ta patience, pour tes passions partagées, pour ton amour, qui ont été une force incroyable pour moi ! À présent, une nouvelle aventure s'offre à nous et je suis pressée de la vivre avec toi.

Merci à tous !

Abréviations

3xTg-AD (modèle) modèle murin triple transgénique de la maladie d'Alzheimer

A

AAV adénovirus associés

AAV-C99 (modèle) modèle murin surexprimant le C99 humain grâce à un vecteur viral (AAV)

A β (peptide) peptide amyloïde

A β_o oligomères de peptide A β

Ach acétylcholine

AICD domaine intracellulaire de l'APP

AMM autorisation de mise sur le marché

APOE apolipoprotéine E

APP protéine précurseuse du peptide amyloïde

APP-CTF fragment C-terminal de l'APP

APPfl protéine APP entière

APP^{sw} protéine APP portant la mutation suédoise

B

BACE enzyme clivant l'APP au niveau du site β

BHE barrière hématoencéphalique

C

C83 aussi appelé α -CTF

C99 aussi appelé β -CTF

C89 aussi appelé β' -CTF

C191 aussi appelé η -CTF

Cat cathepsine

CLEAR (motif) coordinated lysosomal expression and regulation

CMA autophagie médiée par les chaperonnes

D

DNF dégénérescence neurofibrillaire

E

EAL (système – dysfonctionnement) endosomal-autophagique-lysosomal

ECE enzyme de conversion de l'endothéline

ESCRT (machinerie) endosomal sorting complexes required for transport

F

FAD forme familiale de la maladie d'Alzheimer

FT facteur de transcription

G

GSI inhibiteur de la γ -sécrétase

GSM modulateur de la γ -sécrétase

GWAS étude d'association pangénomique

H

HAS haute autorité de santé

I

ICV injection en intracérébroventriculaire

IDE enzyme de dégradation de l'insuline

ILV vésicules intraluminales

iPSC cellules souches pluripotentes induites

L

LCR liquide céphalorachidien

LDLR récepteur aux lipoprotéines de basse densité

LTD dépression à long terme

LTP potentialisation à long terme

M

MA maladie d'Alzheimer

MAM membrane associée aux mitochondries

miR micro ARN

MMP métalloprotéase matricielle

MVB corps multivésiculaire

mTOR cible de la rapamycine chez les mammifères

N

NEP néprilysine

nSMAse sphingomyélinase neutre

O

OMS organisation mondiale de la santé

P

P-Tau Tau phosphorylé

PHF filaments appariés en hélice

PI phosphatidylinositol

PI3P phosphatidylinositol 3-phosphate

PP2A protéine phosphatase 2

PS préséniline (PS1 ou PS2)

R

RE réticulum endoplasmique

RIP protéolyse intramembranaire régulée

ROS espèces réactives de l'oxygène

S

sAD forme sporadique de la maladie d'Alzheimer

SNC système nerveux central

SNP polymorphisme nucléotidique

Syn α -synucléine

T

T-Tau protéine Tau totale

TFEB facteur de transcription EB

TGN trans-Golgi

V

vATPase (pompe) pompe à proton vacuolaire dépendante de l'ATP

VE vésicule extracellulaire

Table des matières

Avant-propos	1
I Implication du fragment C99 dans la maladie d'Alzheimer	3
1 État de l'art sur la maladie d'Alzheimer	5
1.1 La maladie d'Alzheimer en 2019	5
1.1.1 Définitions actuelles	5
1.1.2 Évolution et symptômes	7
1.2 Les caractéristiques neuropathologiques	10
1.2.1 Lésions positives	10
1.2.2 Lésions négatives	13
1.2.3 Des lésions plus précoces ?	15
1.3 L'étiologie	18
1.3.1 Formes familiales	18
1.3.2 Formes sporadiques	21
1.3.3 Prédispositions génétiques	23
1.4 Les aspects cliniques	27
1.4.1 Diagnostic	29
1.4.2 Approches thérapeutiques	30
2 Maturation physiopathologique de l'APP	35
2.1 Le précurseur du peptide amyloïde (APP)	35
2.1.1 Structure	35
2.1.2 Fonctions	38
2.2 Les voies de clivage	40
2.2.1 Description	40
2.2.2 Caractéristiques des sécrétases	43
2.2.3 Rôles physiopathologiques des fragments	52
2.3 Le trafic intracellulaire	56

2.3.1	Convergence subcellulaire de l'APP et de ses sécrétases . . .	58
2.3.2	Importance de la protéine SORLA	61
2.4	L'hypothèse de la cascade amyloïde	63
2.4.1	Postulats de Hardy et Higgins	63
2.4.2	Autres hypothèses proposées?	70
3	Le C99 : nouvel acteur dans la maladie d'Alzheimer?	73
3.1	L'accumulation du C99 dans la maladie d'Alzheimer	73
3.1.1	Études chez la souris	73
3.1.2	Études chez l'Homme	77
3.2	La neurotoxicité du C99 et maladie d'Alzheimer	78
3.2.1	Études initiales	79
3.2.2	Revue récapitulative	80
II	Modulation de l'autophagie : une nouvelle stratégie thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer ?	87
4	Défauts de clairance dans la maladie d'Alzheimer	89
4.1	La clairance du peptide $A\beta$	90
4.1.1	Enzymes hydrolysant l' $A\beta$	90
4.1.2	Dégradation par les microglies et les astrocytes	91
4.1.3	Dégradation par le système ubiquitine-protéasome	92
4.2	Les voies de dégradation endosomale-lysosomale-autophagique (EAL)	94
4.2.1	Rôle central des lysosomes	94
4.2.2	Voie endosomale	97
4.2.3	Voie autophagique	100
4.3	Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer . . .	104
4.3.1	Différentes phases	106
4.3.2	Altérations de la voie endosomale	107
4.3.3	Altérations de la voie autophagique	111
4.3.4	Altération de la fusion et de la dégradation lysosomale . . .	114
5	Modulation du système lysosomal-autophagique : quelles stratégies?	119
5.1	Cibler l'activité des lysosomes	119
5.1.1	Activer les hydrolases	120
5.1.2	Restaurer le pH	121
5.2	Cibler l'autophagie	122

5.2.1	Inducteurs autophagiques dépendants de mTOR	122
5.2.2	Inducteurs autophagiques indépendants de mTOR	123
5.2.3	Autres approches	123
5.3	Combiner les approches?	124
5.4	Le facteur de transcription EB (TFEB)	125
5.4.1	Généralités	125
5.4.2	Altérations du TFEB dans la maladie d'Alzheimer	128
5.4.3	TFEB : cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer?	131
6	Axe 1 : Surexpression du facteur de transcription EB chez les souris	
	3xTg-AD	135
6.1	Hypothèse et objectifs	135
6.2	Objectifs 1 et 2 – Article 1	136
6.2.1	Résumé	137
6.2.2	Article en anglais	137
6.3	Objectif 3 – Analyses comportementales	162
6.3.1	Injections d'AAV8-TFEB en ICV	162
6.3.2	Injections d'AAV8-TFEB par stéréotaxie	164
6.3.3	Injections d'AAV10-TFEB en ICV	166
6.4	Objectif 4 – Approche pharmacologique	168
6.5	Objectif 5 – Fonction du TFEB dans la MA	170
6.5.1	Caractérisation du système L-A chez les souris 3xTg-AD	172
6.5.2	Caractérisation du système L-A chez les patients Alzheimer	175
6.6	Contribution au projet	176
III	Les exosomes : un rôle dans la maladie d'Alzheimer?	179
7	Généralités sur les exosomes	181
7.1	La biogenèse des exosomes	182
7.1.1	Origine	182
7.1.2	Mécanisme	183
7.1.3	Composition	185
7.2	L'étude des exosomes	187
7.2.1	Isolement	187
7.2.2	Caractérisation	188
7.3	Les fonctions physiopathologiques des exosomes	190

7.3.1	Communication intercellulaire	190
7.3.2	Rôles pathologiques	191
7.3.3	Régulations en condition pathologique	191
8	Exosomes et les maladies neurodégénératives	193
8.1	Leur implication dans les maladies à prions	193
8.1.1	Maladies à prions	193
8.1.2	Exosomes : vecteur de la maladie	194
8.2	Leur implication dans la maladie d'Alzheimer	195
8.2.1	Transmission de la pathologie Tau	195
8.2.2	Premières études sur l'A β et les APP-CTFs	197
9	Axe 2 : Enrichissement des formes oligomériques d'APP-CTFs dans les exosomes issus de modèles Alzheimer	203
9.1	Hypothèse et objectifs	203
9.2	Article 2	204
9.2.1	Résumé	205
9.2.2	Article en anglais	207
9.3	Résultats préliminaires et Perspectives	225
9.3.1	Étude du lien entre dysfonctionnement lysosomal-autophagique et exosomes	225
9.3.2	Exosomes, C99 et neuroinflammation ?	228
9.4	Contribution au projet	229
IV	Discussion et perspectives	231
10	Les APP-CTFs au cœur de la maladie d'Alzheimer	235
10.1	Devenir du C99 et maladie d'Alzheimer	235
10.2	Toxicité des APP-CTFs dans la MA	240
10.3	Dimérisation du C99 et des APP-CTFs	243
11	Réduction du C99 : une stratégie thérapeutique ?	247
11.1	Mise en garde contre les inhibiteurs de la γ -sécrétase	247
11.2	Inhibiteurs de la β -sécrétase	249
11.3	Activation de la dégradation lysosomale et autophagique	251
12	Le C99 : un rôle dans la propagation de la MA ?	257

12.1 Exosomes enrichis en C99 : bénéfiques ou délétères?	257
12.2 C99 : biomarqueur de la MA?	260
12.3 Combinaison avec d'autres biomarqueurs?	261
13 Conclusion	263
Annexes	267
Bibliographie	279

Table des figures

1.1	Prévalence de la MA (2010-2050)	6
1.2	Propagation des lésions et stades de Braak	14
1.3	Différents types de lésions dans le cerveau	17
1.4	Facteurs génétiques associés à la MA	26
1.5	Gènes associés à la MA	28
1.6	Évolution des biomarqueurs au cours de la MA	31
2.1	Structure de l'APP	37
2.2	Dimérisation de l'APP	39
2.3	Voies de clivage de l'APP	44
2.4	Structure et assemblage de la γ -sécrétase	48
2.5	Clivage séquentiel du C99	51
2.6	Changement de localisation subcellulaire de PS1 dans les FAD	53
2.7	Mutations de l'APP	57
2.8	Convergence subcellulaire de l'APP et de ses sécrétases	60
2.9	Rôle de SORLA dans le trafic et le métabolisme de l'APP	64
2.10	Description du modèle 3xTg-AD	66
2.11	Hypothèse de la cascade amyloïde révisée	68
4.1	Clairance de l'A β	93
4.2	Convergence de la voie endosomale et de la voie autophagique	95
4.3	Différents types d'autophagie	101
4.4	Mécanisme de la macroautophagie	105
4.5	Gènes de prédisposition et altérations endosomales	108
4.6	Altérations EAL dans la MA	117
5.1	Gènes et mécanismes régulés par TFEB	127
5.2	Mécanisme d'action du TFEB	129
6.1	Surexpression du TFEB chez les souris 3xTg-AD (ICV)	165
6.2	Surexpression du TFEB chez les souris 3xTg-AD (stéréotaxie)	167

6.3	Taux de translocation du TFEB après différents traitement	171
6.4	Régulation des gènes lysosomaux et autophagiques chez les souris 3xTg-AD	174
6.5	Localisation subcellulaire du TFEB sur des coupes de patients Alzheimer	177
6.6	Profil immunohistochimique de la cathepsine D sur coupes de patients Alzheimer	178
7.1	Biogenèse des exosomes	186
7.2	Composition des exosomes	189
8.1	Lien entre dysfonctionnement endolysosomal et sécrétion exosomale	202
9.1	Étude de la sécrétion exosomale en APP-CTFs suite à un traitement Baf A1	227
13.1	L'hypothétique cascade du C99	265

Liste des tableaux

13.1	Gènes de susceptibilité associés aux FAD en lien avec le système EAL	268
13.2	Modèle 3xTg-AD et phénotypes associés en fonction de l'âge	269
13.3	Phénotypes toxiques chez les patients Alzheimer	270
13.4	Synthèse des études montrant la toxicité du C99	271
13.5	Synthèse des études montrant la toxicité du C99 (suite)	272
13.6	Synthèse des études montrant la toxicité du C99 (suite)	273
13.7	Synthèse des études montrant la toxicité du C99 (suite)	274
13.8	Arguments en faveur d'une inhibition de la β -sécrétase comme stratégie thérapeutique pour la MA	275
13.9	Arguments contre une inhibition de la γ -sécrétase comme stratégie thérapeutique pour la MA (suite)	276
13.10	Arguments contre une inhibition de la γ -sécrétase comme stratégie thérapeutique pour la MA (suite)	277
13.11	Méthodes d'isolement des exosomes, avantages et inconvénients . . .	278

Avant-propos

Tenant son nom du médecin qui l'a découvert en 1906, la maladie d'Alzheimer est aujourd'hui un vrai problème de santé. Les chiffres associés à cette pathologie (nombre de malades, coûts financier et humain, nombre de publications scientifiques...) ne cessent d'exploser, excepté un : le nombre de traitements efficaces. Forcés de constater les échecs successifs des essais cliniques, les chercheurs se penchent maintenant sur l'étude de nouveaux acteurs et mécanismes impliqués dans la maladie d'Alzheimer afin de les cibler. Mon projet de thèse s'intègre parfaitement dans cette visée, en s'intéressant d'une part à une stratégie thérapeutique pour cibler un marqueur précoce de la maladie, le fragment C99, et d'autre part à un nouvel acteur de la maladie, les exosomes.

Ce manuscrit sera divisé en 4 parties, qui retraceront au fur et à mesure les données bibliographiques nécessaires à la compréhension de mes travaux de thèse ainsi que les résultats nouvellement générés.

La première partie sera consacrée à l'implication du fragment C99 dans la maladie d'Alzheimer. Après un bref état des lieux des connaissances actuelles sur la maladie, je présenterai le métabolisme et le trafic intracellulaire de l'APP, permettant de comprendre le rôle du C99 dans la pathologie. Enfin, j'exposerai les données actuelles concernant la toxicité du fragment C99 dans la maladie d'Alzheimer, sous forme d'une revue.

La deuxième partie s'intéressera à l'activation de l'autophagie comme stratégie thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer. Pour commencer, je détaillerai les dysfonctionnements du système lysosomal-autophagique associés à cette maladie ainsi que les stratégies proposées pour moduler ce système. Enfin, j'exposerai les résultats obtenus pendant ma thèse concernant ce premier axe de recherche, sous forme d'un article scientifique qui sera complété par des données préliminaires.

La troisième partie se concentrera sur le rôle des exosomes dans la maladie d'Alzheimer. Après des généralités sur les exosomes, je présenterai leur implication dans cette pathologie. Ensuite, je développerai les travaux réalisés pendant ma thèse sur ce deuxième axe de recherche, ayant donné lieu à une publication scientifique ainsi qu'à des résultats préliminaires qui seront utiles pour la suite du projet.

La quatrième partie permettra enfin de faire le lien entre les parties précédentes et d'introduire mes travaux de thèse dans un contexte plus général. Je discuterai notamment des stratégies thérapeutiques actuelles ainsi que l'importance de nouveaux biomarqueurs.

Première partie

Implication du fragment C99 dans la
maladie d'Alzheimer

État de l'art sur la maladie d'Alzheimer

” *There are various reasons why there have been proponents and opponents to the amyloid hypothesis. Part of it is the egos of scientists [...] When people's egos get involved, they lose their objectivity. I think both the pro-amyloid and anti-amyloid schools suffer from that*

— Greengard

1.1 La maladie d'Alzheimer en 2019

1.1.1 Définitions actuelles – Une maladie neurodégénérative

Partout dans le monde, l'espérance de vie augmente. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), la population âgée de 60 ans et plus devrait doubler d'ici 2050 et représenter 2 milliards de personnes dans le monde, entraînant ainsi le phénomène appelé « vieillissement de la population ¹ ». Bien qu'il soit le reflet d'une amélioration de la santé et des conditions socio-économiques, ce phénomène est aussi à l'origine de l'émergence de nouvelles pathologies comme les maladies neurodégénératives. Elles regroupent la maladie d'Alzheimer (MA), la maladie de Parkinson, les maladies à prions, la maladie de Huntington ou encore la sclérose en plaque. **La plus fréquente des maladies neurodégénératives est la maladie d'Alzheimer**, touchant plus de 35 millions de personnes dans le monde et plus de 900 000 personnes en France, sans compter les proches aidants (France Alzheimer).

1. mutation de la répartition de la population en faveur des tranches les plus âgées.

Étroitement liés au vieillissement de la population, ces nombres tendent à tripler d'ici 2050 si aucun changement n'est apporté en terme de diagnostic, traitement ou prévention de la maladie (voir Figure 1.1). Aujourd'hui, la prise en charge médico-sociale de ces malades implique des moyens humains et financiers colossaux, atteignant plus de 9,9 milliards d'euros pour la France uniquement (France Alzheimer). L'ensemble de ces données font aujourd'hui de la maladie d'Alzheimer une urgence en santé publique.

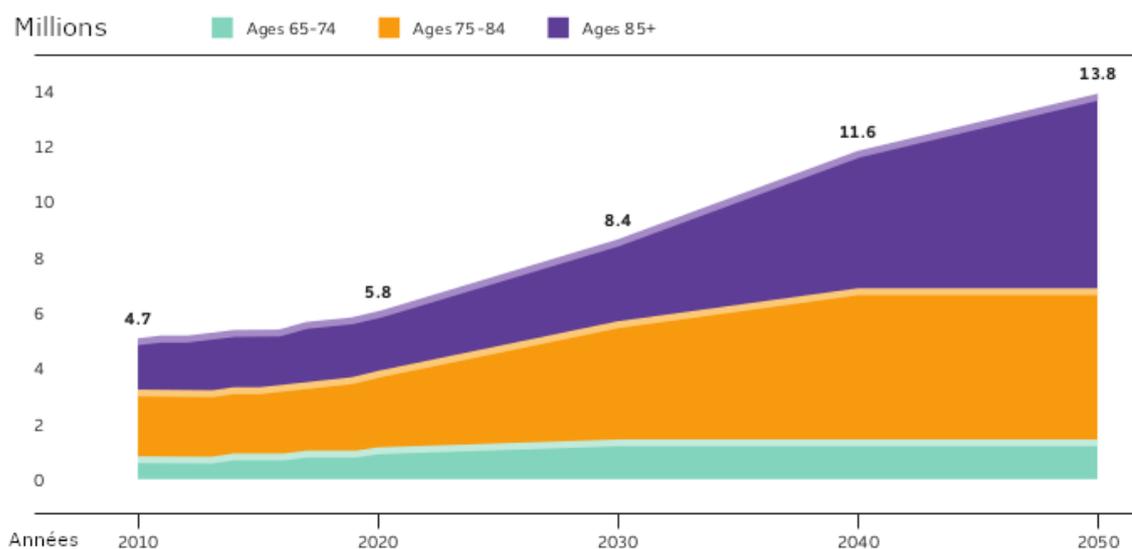


Figure 1.1.: Estimations du nombre de personnes atteintes de la MA au cours des 30 ans à venir

Nombres estimés de personnes de plus de 65 ans atteintes de la MA (total ou par tranche d'âge) dans la population américaine, entre 2010 et 2050 (Alzheimer's association).

Les maladies neurodégénératives sont des pathologies causant une détérioration du fonctionnement normal des cellules nerveuses, suivie de leur mort. Elles provoquent ainsi des problèmes liés au mouvement, appelés ataxies, ou des problèmes liés au fonctionnement mental, appelés démences. Selon l'OMS, la MA est la forme la plus courante de démences, représentant 60 à 70% des cas. **La démence est un syndrome qui se caractérise par une altération des fonctions cognitives plus importante que celle liée au vieillissement normal et affectant la vie quotidienne et sociale.** Plus précisément, elle entraîne une dégradation progressive et irréversible des aptitudes cognitives telles que le langage, la capacité d'apprentis-

sage, la compréhension, le raisonnement, la mémoire, l'orientation, le calcul et le jugement, conduisant à terme à la perte d'autonomie de l'individu. Il existe plusieurs dizaines de démences (démence vasculaire, démence à corps de Lewy, démence fronto-temporale. . .) qui se différencient par la cause de leur développement et les fonctions cognitives touchées. Néanmoins, les limites entre ces différentes formes de démences ne sont pas évidentes et les formes mixtes sont fréquentes (Lancet Commission). Enfin, une définition biologique de la maladie d'Alzheimer a été proposée récemment par le National Institute on Aging-Alzheimer's Association : le « système A, T, N », qui se base sur les biomarqueurs connus de la maladie (voir 1.4.1 Diagnostic).

1.1.2 Évolution et symptômes – Une maladie hétérogène

La maladie d'Alzheimer est une pathologie qui évolue progressivement dans le temps et dans le cerveau (voir 1.2.1 Lésions positives). Les premiers symptômes apparaissent souvent plusieurs décennies après le commencement de la maladie dans le cerveau et sont très variables d'un individu à l'autre. Cependant, les spécialistes s'accordent pour dire qu'il existe **3 stades principaux dans le développement de la MA**, qui sont définis en fonction de l'apparition des symptômes, leur sévérité et leur impact sur la vie quotidienne (Alzheimer's association) :

- La phase dite **asymptomatique**. Elle se caractérise par la présence de modifications anatomiques et biologiques (biomarqueurs) dans le cerveau en l'absence totale de symptômes. Cette phase peut durer des dizaines d'années et résulte probablement de la capacité de compensation du cerveau permettant de maintenir les capacités cognitives (voir 1.6 Évolution des biomarqueurs au cours de la MA).
- La phase dite **symptomatique pré-démentielle ou prodromale**, aussi connue sous le terme anglophone MCI — pour "Mild Cognitive Impairment" —. Elle correspond à l'apparition des premiers troubles de la mémoire, qui sont très légers et n'impactent pas encore la vie quotidienne. De ce fait, le malade est rarement diagnostiqué à ce stade. Ces premières altérations cognitives peuvent être accompagnées de trouble de l'humeur, de l'émotion ou du comportement, qui sont souvent avant-coureurs de la démence.
- La phase dite **symptomatique démentielle**. C'est généralement au début de cette phase que l'entourage du malade est alerté par les troubles mnésiques

et que le diagnostic est posé. Les symptômes les plus évocateurs sont l'aggravation des troubles de la mémoire, mais aussi une altération des fonctions exécutives ou encore des problèmes d'orientation dans l'espace et dans le temps. Cette dernière phase peut être divisée en 3 stades suivant la sévérité des symptômes : léger, modéré et sévère. La maladie conduit souvent à la mort du patient, liée à des complications secondaires comme des pneumonies ou des accidents vasculaires cérébraux.

Parmi les nombreux symptômes retrouvés chez les patients Alzheimer, j'ai détaillé uniquement les troubles de la mémoire et l'apathie car ce sont les deux altérations que j'ai évaluées au cours de mes travaux de thèse chez la souris. Néanmoins, une liste non exhaustive des symptômes pouvant être utilisés pour le diagnostic chez l'Homme est proposée dans la remarque 1 : [Symptômes de la maladie d'Alzheimer](#).

Les troubles de la mémoire Oublier certaines informations est une chose tout à fait normale, quelque soit l'âge. Il a d'ailleurs été montré que ce processus biologique est essentiel pour la mémorisation de nouvelles données (MADRONAL et al., 2016). Cependant, dans le cas de la MA, les oublis deviennent fréquents et ne sont pas liés à un moment d'inattention ou à un stress particulier, on parle alors de troubles de la mémoire. Ils vont toucher les différents types de mémoire au fur et à mesure de la maladie, suivant la progression des lésions dans le cerveau : la mémoire à court terme est altérée en premier et s'en suit un déclin de la mémoire à long terme (la mémoire épisodique puis la mémoire sémantique). La mémoire procédurale est quant à elle préservée pendant très longtemps au cours de la maladie et ce n'est qu'à des stades très avancés que le patient perd les automatismes du quotidien aboutissant à la perte totale d'indépendance. Chez la souris, l'apprentissage et la mémoire à long terme peuvent être évalués grâce à différents tests comportementaux. Un des plus courants est le test de la Piscine de Morris visant à étudier la mémoire spatiale (MORRIS, 1981).

L'apathie Ce comportement se définit par un manque de motivation et d'initiative, l'absence d'émotions et d'intérêt vis-à-vis d'autrui. Les personnes souffrant de la MA présentent souvent précocement une baisse de la motivation dans toutes les activités du quotidien (plaisantes ou non) et n'expriment que peu d'émotions face à tout type de situation. Cette apathie a été mise en évidence chez les patients par

une baisse de l'activité motrice, mesurée par actigraphie ambulatoire. Il semblerait, de plus, que l'apathie soit le syndrome neuropsychiatrique le plus précoce et le plus fréquemment retrouvé chez les patients Alzheimer (ROBERT et al., 2006 ; DAVID et al., 2012). De façon comparable, la mesure de l'activité spontanée chez la souris peut renseigner sur un comportement de type apathique, observé dans certains modèles Alzheimer (PARDOSSI-PIQUARD et al., 2016 ; LALONDE et al., 2002).

Remarque 1 : Symptômes de la maladie d'Alzheimer

1. Stades légers

- Troubles de la mémoire à court terme
- Apathie
- Pertes de jugement
- Difficultés à résoudre des problèmes
- Changements d'humeur et de la personnalité (anxiété, irritabilité, dépression)
- Troubles du sommeil

2. Stades modérés

- Troubles de la mémoire à long terme (épisodique puis sémantique)
- Désorientations dans l'espace et dans le temps
- Difficultés à communiquer, à suivre une conversation (aphasie)
- Difficulté à reconnaître des objets du quotidien, des personnes de son entourage (agnosie)
- Difficultés à planifier, à organiser

3. Stades avancés

- Troubles de la mémoire procédurale
- Difficultés à réaliser des gestes habituels (apraxie)

Il est important de garder à l'esprit que l'évolution de la maladie d'Alzheimer et les symptômes associés peuvent être très variables d'un individu à l'autre, d'autant plus que ces symptômes peuvent aussi être retrouvés chez des personnes atteintes de d'autres pathologies. Enfin, la diversité des tableaux cliniques reflète la complexité de cette maladie et complique considérablement le diagnostic ainsi que le traitement.

1.2 Les caractéristiques neuropathologiques

Les symptômes de la maladie d'Alzheimer sont la conséquence d'un certain nombre de changements structuraux dans le cerveau. Ces modifications sont observables à deux niveaux : **des lésions macroscopiques et des lésions microscopiques**. Alois Alzheimer, neuropathologiste et psychiatre allemand, fut le premier à décrire ces lésions au début des années 1900, avec le cas d'Augusta Deter. Sa patiente présentait des troubles de la mémoire, du langage, des désorientations et des hallucinations. Au vue de son jeune âge, cette forme de démence intrigua le médecin. À la mort sa patiente, il demanda donc son autopsie qui révéla d'une part une importante atrophie cérébrale et d'autre part la présence de dépôts anormaux à l'intérieur et à l'extérieur des neurones (ALZHEIMER et al., 1995). Ces dépôts constituent aujourd'hui les 2 marqueurs histopathologiques de la maladie d'Alzheimer : les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) et les plaques séniles, respectivement (voir Figure 1.3).

1.2.1 Lésions positives – Une protéinopathie

Les dégénérescences neurofibrillaires Bien que décrites pour la première fois en 1906 par Alois Alzheimer, leur structure et leur nature furent élucidées qu'à partir des années 60 par le Dr Michael Kidd et le Dr Jean-Pierre Brion, respectivement (KIDD, 1963; BRION et al., 1985). **Le constituant majeur de ces dépôts est la protéine Tau²**, qui en s'agrégeant à l'intérieur des neurones, entraîne les DNFs. De ce fait, la maladie d'Alzheimer appartient également à la grande famille des tauopathies, comprenant aussi la démence fronto-temporale, la dégénérescence corticobasale ou la paralysie supranucléaire progressive.

La protéine Tau, produite à partir du gène *MAPT* — pour "Microtubule Associated Protein Tau" — (chromosome 17q21), est principalement exprimée dans les neurones et appartient à la famille des protéines associées aux microtubules, ces derniers étant les fibres constitutives du cytosquelette. Par interaction directe avec les microtubules, la protéine Tau participe à leur assemblage et à leur stabilisation, régulant ainsi la dynamique du cytosquelette ainsi que le transport vésiculaire nécessaire à

2. J'ai appris récemment que cette abréviation n'a pas de signification particulière et n'est en réalité pas l'acronyme de "Tubulin Associated Unit" – Luc Buée

la survie du neurone et à la communication entre neurones. Cette interaction est régulée par le niveau de phosphorylation de la protéine Tau, qui est dépendant de différentes kinases ($GSK3\beta$, $CDK5$...). De plus, une hyperphosphorylation entraîne généralement une baisse de l'affinité de Tau pour ces fibres (GUO et al., 2017).

Dans le cas de la MA, la protéine Tau est à la fois anormalement phosphorylée³ et hyperphosphorylée⁴ ce qui provoque sa dissociation des microtubules. Elle va alors s'agréger à l'intérieur des neurones, formant des filaments appariés en hélice (PHF) — pour "Paired Helical Filaments" — aussi appelés fibrilles, qui sont la signature morphologique des DNFs. Cela provoque la déstabilisation et la désintégration des microtubules, aboutissant *in fine* à la mort du neurone. Il est estimé qu'il sécoule environ 20 ans entre les premiers agrégats de Tau dans les neurones et leur mort (GUO et al., 2017).

Les plaques séniles Tout comme les dégénérescences neurofibrillaires, la nature biochimique des dépôts extracellulaires fut découverte des dizaines d'années après leur première description par Aloïs Alzheimer, grâce à des analyses du cerveau et sanguines de patients Alzheimer réalisées par l'équipe du Dr Glenner (GLENNER et C. W. WONG, 1984; MASTERS et al., 1985). Aujourd'hui encore, **il est admis que le peptide amyloïde, aussi appelé peptide $A\beta$, est le constituant principal des plaques séniles**. Ce peptide est dérivé du catabolisme de son précurseur, l'APP — pour "Amyloid Precursor Protein" — (voir 2.2 Les voies de clivage).

Le peptide amyloïde ($A\beta$) est produit de façon physiologique chez tous les vertébrés et tout le long de la vie. Plusieurs rôles physiologiques lui ont été attribués (voir 2.2.3 Rôles physiopathologiques des fragments). Cependant, **dans le cas de la maladie d'Alzheimer, il y a une accumulation anormale du peptide $A\beta$** , causée par une augmentation de sa production ou par un défaut dans sa dégradation en fonction de la forme de la maladie (voir 1.3 L'étiologie). L' $A\beta$ étant sécrété par les neurones et propice à l'agrégation, il finit par former des plaques extracellulaires allant de 10 μm à 160 μm , appelées plaques séniles. Plus précisément, présents en grande quantité dans le cerveau de malades Alzheimer, les monomères d' $A\beta$

3. phosphorylation en des sites qui dans des conditions physiologiques ne sont pas concernés par la phosphorylation – épitopes non-physiologiques.

4. phosphorylation en plus grand nombre d'épitopes physiologiques que dans un cerveau normal.

s'agrègent pour former dans un premier temps des amas solubles, appelés oligomères d'A β (A β_o). Ces oligomères vont ensuite à leur tour s'agréger, devenant de moins en moins solubles et conduisant à la formation de fibrilles, qui sont les éléments de base des plaques séniles. Plusieurs formes d'A β sont connues (de 38 à 43 acides aminés) mais les formes les plus répandues sont l'A β_{40} et l'A β_{42} , l'indice indiquant la taille du peptide en acides aminés. L'A β_{42} est le plus toxique du fait de sa grande capacité d'agrégation (CHEN et al., 2017).

En réalité, **les cerveaux Alzheimer présentent plusieurs types de plaques amyloïdes**, qui se différencient par leur morphologie et leur réactivité aux colorants usuels pour les protéines agrégées (Thioflavine S et rouge Congo). Les deux formes principales retrouvées sont les plaques diffuses et les plaques séniles (voir [Figure 1.3](#) et [remarque 2 : Les différents types de plaques amyloïdes](#)).

Outre leur présence dans les plaques extracellulaires, **les peptides A β peuvent également s'accumuler à l'intérieur des neurones**. Cette accumulation intracellulaire est un phénomène bien plus précoce que la formation des plaques et semble plus toxique. La littérature actuelle est en faveur d'un rôle particulier des oligomères d'A β (A β_o) dans cette toxicité (CHEN et al., 2017).

Remarque 2 : Les différents types de plaques amyloïdes

- **les plaques dites diffuses.** Ces lésions, qui sont caractérisées par leur aspect difforme et diffus, sont proposées comme étant un stade précoce des plaques séniles. Elles ne sont pas détectables avec les colorants habituels (seulement avec des anticorps dirigés contre l'A β) et sont majoritairement constituées d'A β_{42} .
- **les plaques dites focales.** Elles correspondent à ce qu'on appelle plus communément les plaques séniles et sont détectables avec les différentes colorations citées précédemment. Elles apparaissent comme des dépôts sphériques extraneuronaux, caractérisés par un cœur très dense enrichi en A β_{42} (cœur amyloïde) et entouré d'une couronne composée de neurites dystrophiques et d'astrocytes réactifs. D'autres éléments y sont également retrouvés comme la protéine APOE 4 ou encore un excès de lysosomes et de mitochondries. L'accumulation massive de lysosomes près des agrégats extracellulaires d'amyloïdes est particulièrement intéressante car elle est observée à des stades précoces dans la formation des plaques. De plus, ces lysosomes sont dépourvus d'un grand nombre de protéases nécessaires à leur activité, ce qui laisse penser que ce sont des formes immatures des lysosomes incapables de dégrader les protéines en excès ou toxiques (GOWRISHANKAR et al., 2015).

D'autres dépôts ont également été décrits dans le cerveau des patients Alzheimer ("laineux" dans la couche profonde du cortex entorhinal, "en flaque" dans le présubiculum ou "stellaires"; en fonction de leur aspect) mais également au niveau de la paroi des petits et moyens vaisseaux. Cette agrégation d'A β dans les vaisseaux provoque une angiopathie amyloïde cérébrale, à l'origine d'hémorragies ou de micro-anévrismes.

La propagation des lésions au cours de la maladie L'apparition des lésions microscopiques est un processus lent, qui débute dans des aires cérébrales distinctes en fonction de la nature des protéines impliquées ($A\beta$ ou Tau) et qui se propage à des vitesses différentes. L'étude histologique en *post-mortem* d'un grand nombre de cerveaux de patients Alzheimer a permis de développer une classification pour les lésions amyloïdes et pour les DNFs, décrite respectivement par le Dr Thal (stades A à C) (THAL et al., 2002) et par le Dr Braak (stades I à VI) (H. BRAAK et E. BRAAK, 1991 ; H. BRAAK et al., 2006). Les plaques séniles apparaissent avant les DNFs et elles suivent une propagation dite centripète débutant dans le néocortex, atteignant dans un second temps l'hippocampe et le cortex enthorinal jusqu'au cervelet à des stades avancés. Au contraire, les DNFs présentent une propagation dite centrifuge, apparaissant en premier dans le cortex enthorinal puis dans l'hippocampe et enfin dans le néocortex à des stades très avancés (voir [Figure 1.2](#)). Le progression des DNFs semble néanmoins mieux corrélérer avec la sévérité des symptômes que celle des plaques amyloïdes. Ces deux lésions sont considérées comme des marqueurs tardifs de la MA.

1.2.2 Lésions négatives – Une maladie irréversible

L'atrophie cérébrale La diminution de taille du cerveau est l'altération macroscopique principale de la maladie d'Alzheimer (voir [Figure 1.3](#)). Elle est progressive et touche plusieurs structures en lien avec le processus de mémorisation : le cortex entorhinal qui est le plus souvent le premier site atteint, l'hippocampe et l'amygdale (DUYCKAERTS et DICKSON, 2011). L'atrophie hippocampique, évaluée par imagerie cérébrale, est souvent utilisée comme indice pour le diagnostic. Une étude récente, basée sur un modèle informatique reproduisant l'évolution et la dynamique du cerveau sur une vie entière, montre d'ailleurs que l'hippocampe et l'amygdale sont atrophiés dès l'âge de 40 ans chez les modèles Alzheimer (COUPÉ et al., 2019). Cette atrophie s'accompagne également d'un rétrécissement des circonvolutions, temporales et frontales principalement, d'un élargissement des sillons corticaux et d'une dilatation des ventricules cérébraux (voir [Figure 1.3](#)). L'ensemble de ces modifications conduit à une diminution du volume et du poids du cerveau, observables lors de l'examen *post-mortem*. Cette atrophie est la conséquence d'une diminution du nombre de neurones dans ces aires (perte neuronale) mais aussi de la diminution du nombre de connexions entre neurones (perte synaptique).

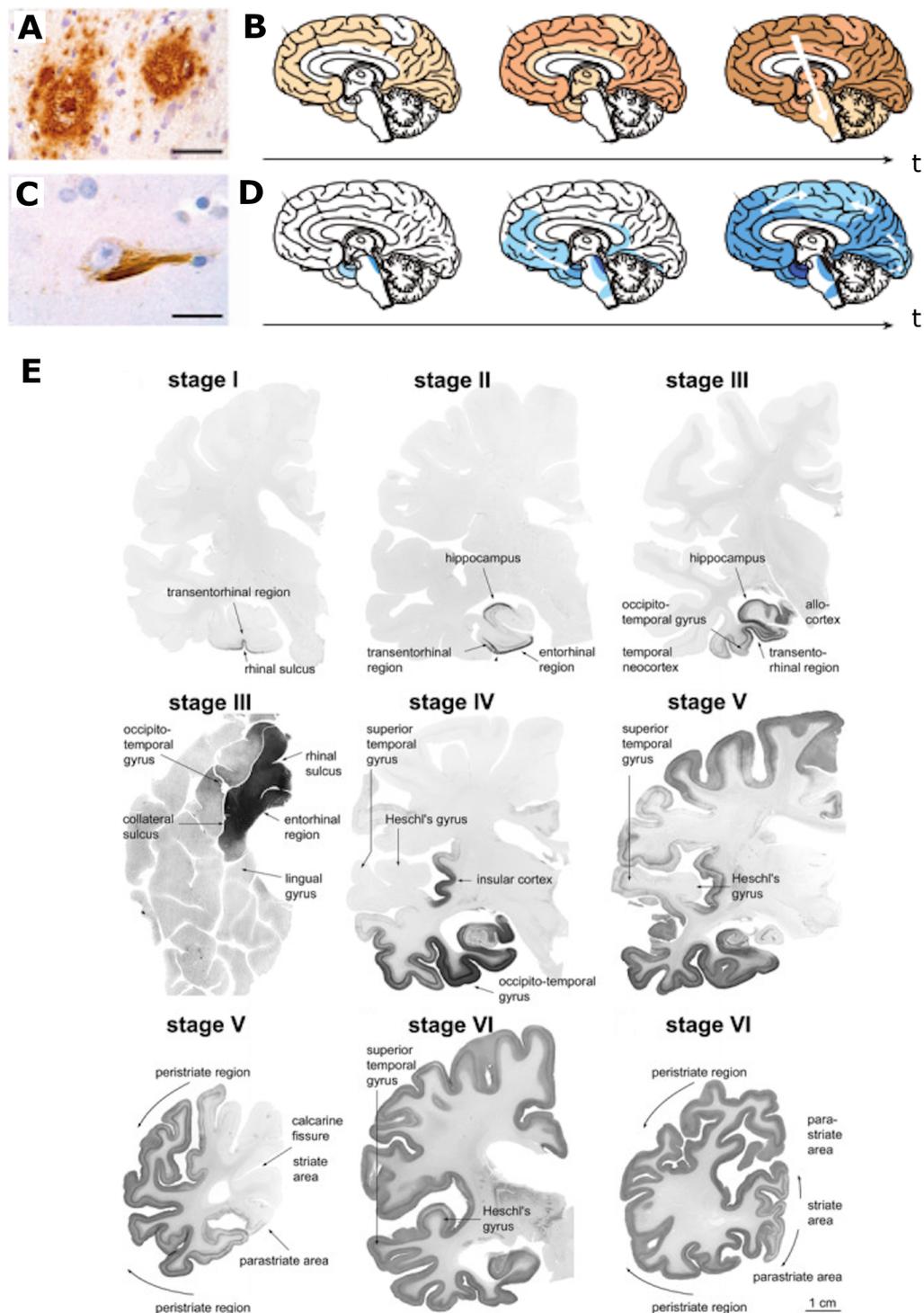


Figure 1.2.: Propagation des plaques amyloïdes et des DNFs chez des patients Alzheimer et description des stades de Braak

(A) Plaques séniles et (C) DNFs dans le cerveau d'un patient Alzheimer (B et D) Propagation spatio-temporelle (B) de type centripète pour les plaques amyloïdes (du néocortex vers les noyaux gris centraux) (D) de type centrifuge pour les DNFs (du cortex transenthorinal vers le néocortex) (E) Définition des stades de Braak (I à V) en fonction de la propagation des DNFs (Sources : JUCKER et WALKER, 2013 ; H. BRAAK et al., 2006).

La perte neuronale La mort neuronale observée chez les patients atteints de MA est progressive, irréversible et touche principalement les neurones pyramidaux, cholinergiques et noradrénergiques. Elle a longtemps été attribuée aux dégénérescences neurofibrillaires, en raison d'une importante perte neuronale dans les zones où les DNFs sont abondantes (GRIGNON et al., 1998). Cependant des études plus récentes ont montré qu'elle est une caractéristique précoce de la MA, bien avant l'apparition des DNFs et même des plaques. Plusieurs hypothèses ont été proposées quant à son origine mais la plus admise aujourd'hui implique les peptides d'A β , qui en s'accumulant à l'intérieur des neurones, entraînent la mort programmée par apoptose (MUKHIN et al., 2017). Cette perte neuronale, caractéristique récurrente chez l'Homme, est pourtant un des phénotypes les moins évidents à reproduire dans les modèles animaux de la MA.

La perte synaptique La perte d'intégrité des synapses est une caractéristique centrale et précoce dans la MA. Elle est la conséquence de l'altération des synapses à plusieurs niveaux et elle précède la mort neuronale. Dans les cerveaux de patients Alzheimer, il a été observé une réduction du nombre de synapses par neurone (DAVIES et al., 1987), une perte des épines dendrites (SHANKAR et al., 2007) et un déficit de plusieurs neurotransmetteurs ou de leur récepteur (acétylcholine, glutamate, GABA, sérotonine...). La perte synaptique est parmi l'ensemble des marqueurs décrits jusqu'ici celui qui corrèle le mieux avec les déficits mnésiques (de WILDE et al., 2016). Cette dysfonction synaptique est retrouvée chez un grand nombre de modèles animaux de la MA, illustrée souvent par les déficits électrophysiologiques (potentialisation à long terme (LTP) et dépression à long terme (LTD)).

1.2.3 Des lésions plus précoces ?

Les dysfonctionnements endosomal, lysosomal et autophagique Ces dernières années un grand nombre d'études ont montré l'altération, à plusieurs niveaux, de la voie de dégradation Endosomale-Autophagique-Lysosomale (EAL) chez les patients Alzheimer (voir Figure 1.3). Ce dysfonctionnement EAL est un des phénotypes les plus fréquemment observés et est considéré comme un marqueur cellulaire précoce de la MA. Il est, de plus, commun à un grand nombre de maladies neurodégénératives. L'étude de ce dysfonctionnement est au cœur de mes travaux de thèse et

sera détaillée dans la partie [4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer](#).

La neuroinflammation Depuis plusieurs années, l'étude de la neuroinflammation dans le contexte de la MA a connu un engouement particulier. Pourtant Alois Alzheimer fut le premier à suggérer son implication dans la pathologie, avec ses croquis représentant pour la première fois les microglies, décrites comme abondantes autour des plaques (ALZHEIMER et al., 1995). L'implication de la neuroinflammation dans la MA est aujourd'hui largement acceptée, mais son rôle en tant que mécanisme protecteur ou délétère est encore discuté, tout comme sa position en tant que cause ou conséquence de la maladie. Elle se caractérise par une activation importante des cellules immunitaires et résidentes du cerveau, les microglies et les astrocytes, accompagnée par la libération de différentes cytokines (HENEKA et al., 2015) (voir [Figure 1.3](#)).

Dans un premier temps, la réponse immunitaire apparaît comme protectrice, permettant notamment la clairance du peptide $A\beta$ et la libération de cytokines pro-inflammatoires ($TFN\alpha$, IL6, IL1 β ...). D'autre part, en encerclant les plaques, les microglies constituent une sorte de rempart, contre une accumulation supplémentaire d' $A\beta$ au niveau de la lésion existante. Au fur et à mesure que la maladie progresse, les microglies vont changer de phénotype (conversion de M1 à M2) et produire, dans un deuxième temps, des cytokines anti-inflammatoires ($TGF\beta$, IL4...), à l'origine d'une inflammation chronique qui devient délétère. D'autre part, une astrogliose est également observée dans le cerveau des patients Alzheimer, correspondant à une réponse pathologique des astrocytes devenus "réactifs".

L'intérêt pour la neuroinflammation est d'autant plus grand qu'elle apparaît à des stades très précoces de la MA (HAMELIN et al., 2016). Enfin, certains facteurs de risques génétiques impliqués dans la neuroinflammation ont été associés au développement de la MA (TREM2, CD33...) (voir [1.3.3 Prédispositions génétiques](#) et [4.1 La clairance du peptide \$A\beta\$](#)).

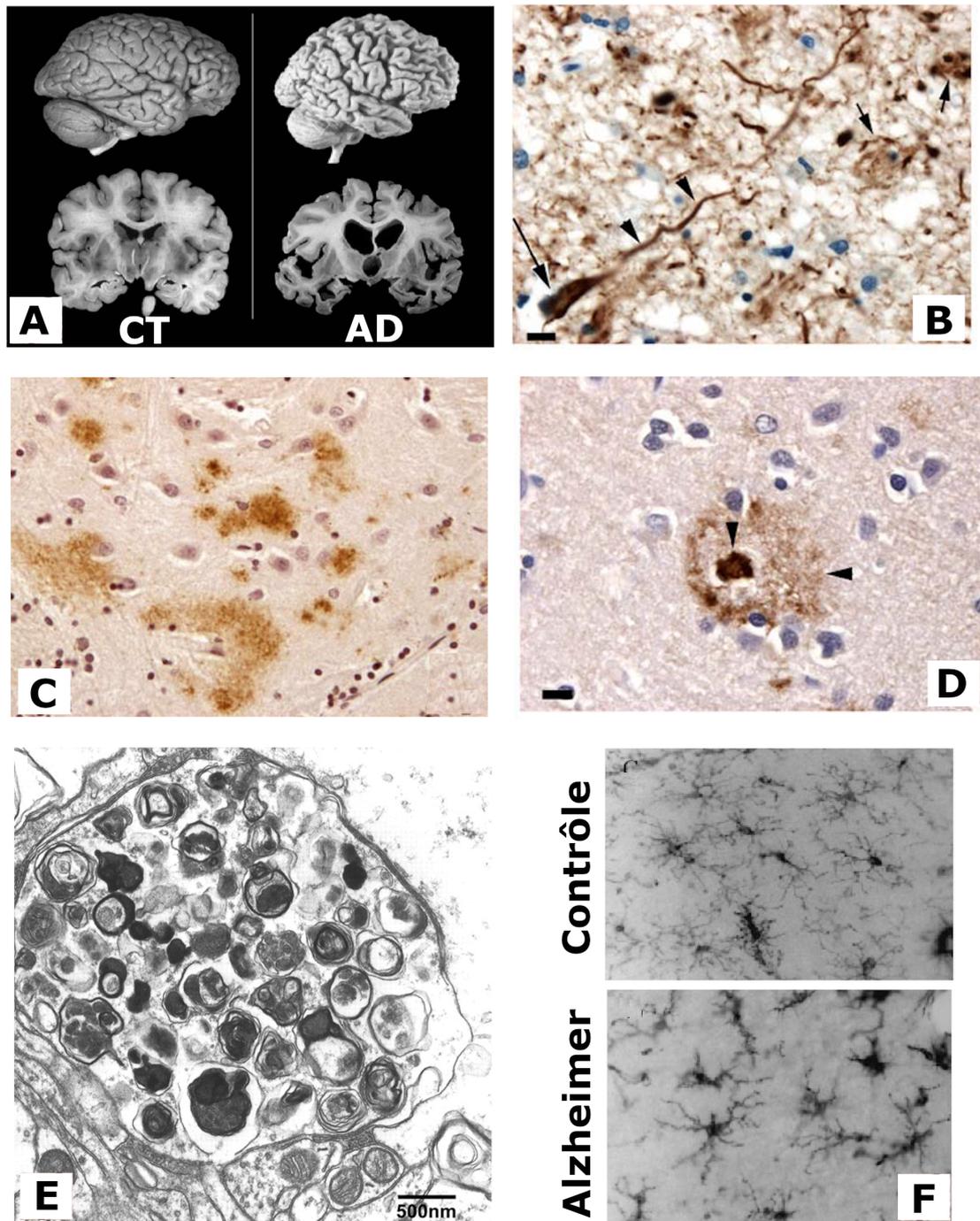


Figure 1.3.: Différents types de lésions (positives et négatives) dans le cerveau de patients Alzheimer

Plusieurs lésions cérébrales sont associées à la MA : (A) Atrophie du cerveau accompagnée d'un élargissement des sillons corticaux et une dilatation des ventricules (CT = contrôle, AD = Alzheimer) (B) Dégénérescences neurofibrillaires : accumulation de protéines Tau dans les épines dendritiques (triangle), qui conduit aux DNFs (flèche longue) et à des fantômes de DNFs (flèche courte) (C-D) Plaques amyloïdes : (C) plaques diffuses et (D) plaques séniles caractérisées par un cœur amyloïde et une couronne de neurites dystrophiques (E) Dysfonctionnement EAL : accumulation de vésicules autophagiques immatures dans les neurites dystrophiques (F) Neuroinflammation : activation des microglies (Sources : DUYCKAERTS et al., 2009 ; NIXON, 2007 ; LOPES et al., 2008 ; BAGAD et al., 2013)

La maladie d'Alzheimer est caractérisée par deux types de lésions : les lésions négatives (perte neuronale et synaptique) qui sont celles qui corréleront le mieux avec les symptômes de la maladie et les lésions positives, correspondant à une accumulation anormale de protéines. Ces dernières sont distinctes de par leur nature et leur distribution dans le cerveau. L'accumulation de protéines agrégées constitue une caractéristique commune à un ensemble de pathologies, appelées protéinopathies, dont fait partie la maladie d'Alzheimer. Cependant, ces lésions sont retrouvées dans d'autres pathologies ou même chez un patient sain, ce qui signifie que prises séparément elles ne peuvent pas constituer un moyen de diagnostic. Enfin, elles apparaissent relativement tard dans le développement de la maladie, d'où l'intérêt d'étudier des altérations plus précoces.

1.3 L'étiologie

Malgré les nombreuses recherches sur la maladie d'Alzheimer ces dernières années, son origine exacte est encore inconnue dans la majorité des cas. En effet, **la maladie existe sous deux formes : une forme héréditaire**, c'est-à-dire d'origine familiale, qui concerne seulement 1 à 2 % des cas, et **une forme dite sporadique**, causée par un ensemble de facteurs de risque et touchant les 98 à 99 % restants. Le point commun entre ces deux formes est la présence, chez tous les patients, des deux marqueurs histopathologiques tardifs (plaques séniles et DNFs) et de la démence. Alors que les formes familiales sont liées à une production anormale du peptide $A\beta$, les formes sporadiques, elles, se caractérisent par un défaut de la dégradation de ce peptide, ce qui conduit à une cinétique d'apparition de la maladie différente entre ces deux formes.

1.3.1 Formes familiales – Une maladie héréditaire

Les formes familiales de la maladie d'Alzheimer (**FAD**) sont rares et se caractérisent par un développement très précoce de la maladie, les symptômes apparaissant entre 30 et 50 ans (voir **Figure 1.5**). Ces formes sont liées à des mutations génétiques et leur transmission est dite autosomique dominante, ce qui signifie que la possession d'un seul allèle muté suffit pour induire la maladie. Des études génétiques

ont permis de mettre en évidence à l'heure actuelle **3 gènes dont diverses mutations conduisent au développement de la maladie d'Alzheimer : les gènes APP, PSEN1 et PSEN2**. Ces gènes sont tous impliqués dans la production du peptide amyloïde : l'APP est la protéine précurseur de l'A β et les présinillines 1 et 2 (PS1, PS2) sont des protéines impliquées dans le clivage de l'APP en A β . Les mutations sur le gène PSEN1 sont les plus fréquentes dans les FAD. À ce jour, aucune mutation de Tau n'a été démontrée comme étant à l'origine de la maladie d'Alzheimer. Son hyperphosphorylation, sa troncation et son agrégation dans la MA sont plutôt considérés comme une conséquence de l'accumulation d'A β , mais ce lien reste encore controversé.

Gène APP Le gène APP, localisé sur le chromosome 21 (21q21.3) et codant pour la protéine du même nom — pour "Amyloid Precursor Protein" —, fut le premier à être incriminé dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer, par l'équipe du Dr Hardy en 1991 (J. HARDY et ALLSOP, 1991). Sa séquence fut découverte 4 ans plus tôt par l'équipe du Dr Kang, grâce à la publication de la séquence d'acides aminés du peptide A β et à l'étude d'un grand nombre de patients atteints de la MA ou de Trisomie 21 (KANG et al., 1987). En effet, ces derniers possèdent une copie supplémentaire du chromosome 21 et présentent très jeunes les symptômes de la MA. De plus, deux arguments sont venus renforcer plus tard l'implication de l'APP dans les FAD : (1) certains patients, présentant une forme rare de trisomie 21 dans laquelle il y a la duplication uniquement de la partie distale du chromosome 21 mais pas de la séquence de l'APP, ne développent pas les symptômes de la MA (PRASHER et al., 1998) (2) au contraire, d'autres, possédant des micro-duplications du chromosome 21 uniquement au niveau de la séquence de l'APP, développent précocement la MA mais pas de trisomie 21 (ROVELET-LECRUX et al., 2006).

La première mutation pathogène de l'APP fut décrite chez une famille anglaise, la mutation Londonienne, développant la maladie autour de 57 ans (J. HARDY et ALLSOP, 1991 ; GOATE et al., 1991). Elle est une des mutations de l'APP les plus courantes dans les FAD. Aujourd'hui, plus de 50 mutations sur le gène de l'APP ont été répertoriées dont au moins 32 sont pathogènes dans le contexte de la MA (Alzforum). La majorité sont des mutations ponctuelles et se situent au niveau des sites de clivage de l'APP par les sécrétases, nécessaires à la production du peptide A β (voir Figure 2.7). Les différentes mutations entraînent des phénotypes variables quant à la production d'A β mais la plupart entraîne une potentialisation

du clivage de l'APP en $A\beta$. En revanche, celles ayant lieu dans la séquence de l' $A\beta$ conduisent à une augmentation de la capacité d'agrégation de l' $A\beta$ et non de sa production (voir remarque 3 : conséquences des principales mutations sur le gène APP). Le modèle murin utilisé dans mon équipe, appelé souris triple transgéniques (3xTg-AD) porte la mutation dite suédoise, qui correspond en réalité à la mutation de deux acides aminés (K670N et M671L) situés en amont de la séquence de l' $A\beta$. Elle conduit à une augmentation de la production d' $A\beta$ totale, induite par une augmentation de la coupure par la β -sécrétase (APP en C99) (voir 2.2 Les voies de clivage). Enfin, c'est une des mutations les plus étudiées dans des modèles cellulaires et animaux.

Remarque 3 : conséquences des principales mutations sur le gène APP

- **Double mutation suédoise (K670N, M671L)** : augmentation de la production d' $A\beta$ total ($A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$) mais ne change pas le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ – mutation utilisée dans le modèle 3xTg-AD
- **Mutation flamande (A692G)** : augmentation $A\beta_{42}$ et $A\beta_{40}$ sécrétés
- **Mutation arctique (E693G)** : facilite l'agrégation d' $A\beta$
- **Mutation hollandaise (E693Q)** : facilite l'agrégation d' $A\beta$
- **Mutation ibérique (I716)** : augmentation de la production d' $A\beta_{42}$ et le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$
- **Mutation londonienne (V717I)** : augmentation de la production d' $A\beta_{42}$ et le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$
- **Mutation islandaise (A673T)** : c'est la seule mutation protectrice contre la MA qui diminue la production d' $A\beta$ de près de 40%

PSEN1 et PSEN 2 Les présénillines (PS) constituent le site catalytique du complexe γ -sécrétase, qui est impliqué dans le clivage de l'APP et la formation du peptide $A\beta$ (voir 2.2 Les voies de clivage). Les mutations sur le gène *PSEN 1* représentent environ 70% des cas de FAD et conduisent à des formes très agressives de la maladie. Le gène *PSEN1* est situé sur le chromosome 14 (14q24.2) et les premières mutations de ce gène ont été décrites en 1995 par l'équipe du Dr Saint-George-Hyslop. À l'heure actuelle, plus de 300 mutations potentiellement pathogènes sur *PSEN1* ont été identifiées (Alzforum). Ces mutations ponctuelles sont majoritairement situées au niveau des séquences correspondantes aux domaines intermembranaires de la protéine PS1, bien qu'il ait été rapporté des mutations sur chacun des domaines constituant la protéine. La première mutation décrite et une des plus retrouvées chez les patients FAD est la substitution de la méthionine 146 en valine (M146V). Elle est également une mutation couramment utilisée pour la génération des modèles animaux de la maladie d'Alzheimer, présente notamment

dans le modèle 3xTg-AD. Les mutations sur le gène *PSEN2*, situé sur le chromosome 1 (1q42.13), sont beaucoup plus rares et seulement 18 mutations ont été corrélées aux FAD à ce jour (Alzforum).

Gain ou perte de fonction ? De par l'implication des PS dans le catabolisme de l'APP, les recherches se sont intéressées à savoir si les mutations de *PSEN 1* et *PSEN2* retrouvées dans la MA étaient plutôt gain ou perte de fonction. De façon logique, les premières hypothèses ont proposé une augmentation de l'activité des PS, pouvant expliquer de façon simple l'augmentation de l' $A\beta$ (plus d'activité enzymatique, plus de produit). Cependant, plusieurs études récentes suggèrent le contraire. En effet, l'étude du Dr Sun, analysant plus de 130 mutations de *PSEN1* retrouvées dans les FAD, indique que 90% de ces mutations provoqueraient une diminution partielle ou totale de l'activité γ -sécrétase alors que les 10% restants n'affecteraient pas cette activité (L. SUN et al., 2017). L'effet de ces mutations sur la production d' $A\beta$ semble donc, en réalité, très complexe et reste toujours controversé. Les données actuelles convergent plutôt vers l'idée que ces mutations induiraient un changement de la nature des $A\beta$ produits, en faveur des formes plus longues et plus toxiques, conduisant à une augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Ce phénotype est d'ailleurs retrouvé avec la mutation *PSEN1* M146V. Les mutations sur *PSEN2* semblent tout autant complexes et conduisent à des profils pathologiques différents de celles sur *PSEN1*. Ces aspects seront discutés dans la partie [2.2.2 Caractéristiques des sécrétases](#), décrivant le rôle des présénilines dans le clivage de l'APP.

1.3.2 Formes sporadiques – Une maladie multifactorielle

Les formes sporadiques de la maladie d'Alzheimer (**sAD**) sont très fréquentes (plus de 98% des cas) et apparaissent majoritairement après l'âge de 65 ans (voir [Figure 1.5](#)). Néanmoins, certains auteurs distinguent deux formes sporadiques différentes en fonction de l'âge d'apparition des symptômes : les formes précoces — Early-Onset Alzheimer Disease (**EOAD**) – qui se manifestent avant 60-65 ans et qui sont rares (10%) mais plus sévères, en opposition avec les formes tardives – Late-Onset Alzheimer Disease (**LOAD**) – qui se développent après 65 ans. Contrairement aux formes héréditaires, **les formes sporadiques ne sont pas causées par des mutations monogéniques à forte pénétrance, mais par une combinaison**

de différents facteurs : âge, prédispositions génétiques et facteurs environnementaux. On parle alors de maladie multifactorielle. Conséquence de la grande variabilité des facteurs impliqués, ces formes sont très hétérogènes d'un point de vue clinique et les mécanismes à l'origine de leur développement sont très flous.

L'âge et le sexe L'âge est le principal facteur de risque. En effet la prévalence de la MA est fortement augmentée après 65 ans et explose à partir de 85 ans : 3% des personnes âgées entre 65-74 ans, 17% des personnes âgées entre 75-84 ans et 32% des personnes âgées de 85 ou plus sont atteintes de la MA (Alzheimer's association). Cependant, cette n'est pas la conséquence d'un vieillissement normal, un âge avancé n'étant pas suffisant pour développer la maladie mais elle est perçue par certains comme un vieillissement accéléré et donc pathologique.

Le sexe apparaît aussi comme un facteur de risque, les femmes étant plus touchées que les hommes à partir de 80 ans. En effet, le déclin cognitif semble plus prononcé et plus rapide chez les femmes. Pendant longtemps, cette donnée a été expliquée par la différence d'espérance de vie entre les 2 sexes, mais des études plus récentes ont également proposé l'implication des hormones dans ce processus, et plus précisément les œstrogènes dont la production est arrêtée à la ménopause. Cette hypothèse est renforcée par des études montrant que les femmes ayant subi des ménopauses chirurgicales à un âge précoce ont plus de risque de développer la MA (BOVE et al., 2014; PINES, 2016). Cette différence est également observée dans certains modèles animaux de la maladie, comme le modèle 3xTg-AD, dont les femelles développent les pathologies $A\beta$ et Tau de façon plus précoce et plus sévère. Cependant, aucune différence quant à la production d' $A\beta$ ou l'hyperphosphorylation de Tau n'est observée entre les deux sexes chez l'Homme (FERRETTI et al., 2018).

Les facteurs environnementaux Bien qu'il existe plusieurs gènes de prédisposition à la MA, un grand nombre de données issues d'études épidémiologiques suggère l'implication de facteurs environnementaux dans la survenue de la MA. Les facteurs de risque associés à la maladie peuvent être regroupés en 4 grandes catégories : (1) ceux liés à la présence d'une autre pathologie (obésité, diabète de type II, hypertension...) (2) ceux liés à l'hygiène de vie (alimentation riche en acides gras, manque d'activité physique, consommation d'alcool, troubles du sommeil...) (3) ceux liés à l'entraînement cérébral (faible niveau d'éducation, manque d'activités

mentale et sociale...) et (4) ceux liés à la pollution environnementale (particules en suspension, pesticides, certains métaux neurotoxiques...) (REITZ et MAYEUX, 2014).

Ces facteurs de risque sont souvent associés de façon plus générale à la démence et les mécanismes cellulaires à l'origine de leurs effets ne sont pas bien connus. Néanmoins, la connaissance de ces facteurs permet la mise en place de moyens de prévention, qui est une stratégie thérapeutique importante pour la MA, sachant qu'il n'y a ce jour aucun traitement curatif pour la maladie (voir [1.4.2 Approches thérapeutiques](#)). La première étude d'intervention ayant abouti à des conclusions positives est l'étude FINGER — pour "the Finnish Geriatric Intervention Study to Prevent Cognitive Impairment and Disability" — publiée en 2015, qui avait pour but d'étudier l'influence de plusieurs facteurs environnementaux chez un groupe d'individus sains ou Alzheimer. Cette étude a mis en évidence de façon intéressante l'importance d'un régime méditerranéen et de l'activité physique dans la prévention de la MA (NGANDU et al., 2015).

1.3.3 Prédispositions génétiques

Bien que les formes sporadiques de la MA ne soient pas héréditaires, la part génétique dans leur développement est très importante. En effet, les scientifiques estiment l'implication de la génétique dans 70% des cas et les 30% restants seraient liés aux facteurs environnementaux. D'une manière intéressante et en accord avec l'hypothèse amyloïde (voir [2.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde](#)), un grand nombre des gènes de prédisposition identifiés à ce jour semble avoir un lien direct avec l'APP et l'A β (métabolisme, transport intracellulaire, dégradation...) (voir [Figure 1.5](#)). Les gènes de prédisposition, aussi appelés gènes de susceptibilité, correspondent le plus souvent en réalité à des polymorphismes, qui sont des variations d'une seule paires de base entre individus de la même espèce. Contrairement aux mutations familiales, ces changements génétiques ne sont pas directement responsables de la maladie mais peuvent favoriser plus ou moins fortement son apparition. Le gène *APOE* est aujourd'hui, de loin, le facteur le plus fréquent chez les patients sAD, affectant environ 62% des cas sporadiques présentant cet allèle, mais son rôle dans la survenue de la maladie n'est toujours pas clairement défini, probablement une combinaison de plusieurs effets.

APOE ϵ 4 Le gène *APOE*, et plus précisément l'allèle ϵ 4, fut le premier facteur de risque à être identifié en 1993 (STRITTMATTER et al., 1993 ; CORDER et al., 1993) et est également **le premier facteur de prédisposition génétique associé aux SAD**. Ce gène est situé sur le chromosome 19 (19q13.32) et code pour l'apolipoprotéine E (**APOE**), qui est produite majoritairement dans le foie et le cerveau. Cette protéine est impliquée dans le catabolisme et le transport des lipides, notamment le cholestérol, et est donc essentielle à l'entretien et au remodelage des membranes au niveau des sites de connexion entre synapses. De plus, le cholestérol joue un rôle important dans le métabolisme de l'APP ainsi que dans l'agrégation des produits de l'APP (voir [2.3 Le trafic intracellulaire](#)).

Chez l'Homme le gène *APOE* existe sous 3 allèles différents : ϵ 2, ϵ 3 et ϵ 4. La forme ϵ 3 est la forme la plus commune, retrouvée chez 75 à 80% de la population, la forme ϵ 2 est protectrice contre la MA alors que la forme ϵ 4 augmente le risque de développer la maladie (CORDER et al., 1993) (voir remarque [4 : isoformes de l'APOE](#)). En effet, les personnes héritant d'une seule copie de la forme ϵ 4 (hétérozygote ϵ 3/ ϵ 4) ont 3 fois plus de risque de développer la maladie et ce risque est 8 à 12 fois plus important chez les homozygote ϵ 4/ ϵ 4 (FARRER et al., 1997). La protéine APOE4 est retrouvée dans les plaques séniles et ses niveaux sont inversement corrélés aux dépôts amyloïdes (J.-C. LAMBERT et al., 2005). Enfin, les porteurs de la forme APOE4 ϵ 4 présentent également des dysfonctionnements au niveau du système endosomal – lysosomal – autophagique, qui se manifestent par une augmentation de la quantité d'endosomes et de lysosomes (NURIEL et al., 2017), une dérégulation de l'acidification des lysosomes (NURIEL et al., 2017) et des modifications dans la maturation des autophagosomes (ZHU et al., 2015) (voir [4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer](#)).

Remarque 4 : isoformes de l'APOE

Les 3 isoformes de l'APOE diffèrent de 2 acides aminés et de par leur prévalence dans la population mondiale :

- APOE 2 (Cys 112 et Cys 158) – \approx 5% de la population
- APOE 3 (Cys 112 et Arg 158) – \approx 75% de la population
- APOE 4 (Arg 112 et Arg 158) – \approx 20% de la population mais au moins un allèle est retrouvé chez 50% des malades Alzheimer

La fonction de clairance de l'APOE est dépendante de l'isoforme, l'APOE 2 ayant une efficacité plus importante alors que celle de l'APOE 4 est réduite.

(WU et ZHAO, 2016).

Importance des études GWAS Jusqu'en 2009, le gène *APOE* était le seul facteur de prédisposition identifié pour la maladie d'Alzheimer. Mais le développement des études d'association pangénomique (**GWAS**) ainsi que le séquençage du génôme et de l'exome ont permis de mettre en évidence, à l'heure actuelle, 27 gènes (loci) associés à un risque plus accru de développer la MA et les polymorphismes associés. La majorité des informations issues de ces études est répertoriée dans la base de données Alzgene (<http://www.alzgene.org/>) et proviennent de la plus grande étude internationale, *The International Genomics of Alzheimer Project*, réalisée en 2013 (IGAP et SCHELLENBERG, 2012). La majorité des facteurs génétiques à risque pour la MA sont impliqués dans 3 grands mécanismes cellulaires : le métabolisme du cholestérol (*APOE*, *ABCA7*...), l'endocytose et le transport vésiculaire (*PICALM*, *SORLA*, *BIN 1*...) et la réponse immunitaire (*TREM 2*, *CD33*...) (voir **Figure 1.4**).

Gènes de prédisposition en lien avec le système endosomal – lysosomal – autophagique Comme évoqué précédemment, le dysfonctionnement du système de dégradation EAL est un marqueur précoce de la MA. De façon intéressante, **plusieurs gènes impliqués directement ou indirectement dans la régulation de l'endocytose – *BIN1*, *CD2AP*, *PICALM*, *RIN3*, *SORL1* — ou dans la régulation des lysosomes – *GRN*, *PLD3*, *SORL1* — ont été rapportés comme étant des facteurs de risques pour la MA**, en plus de l'*APOE 4* (VAN ACKER et al., 2019). *BIN1* est d'ailleurs le deuxième gène de susceptibilité après *APOE4*. Les variants pathogènes de ces gènes provoquent une altération du système EAL, entraînant d'une part un défaut de clairance du peptide $A\beta$ et de la protéine Tau et d'autre part des modifications dans la localisation et le trafic de l'APP (voir **4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer**, **Figure 4.6** et **Table 13.1**). Ces données montrent l'importance d'étudier et de cibler ce mécanisme dans la MA.

Parmi ces gènes de prédispositions, j'attire votre attention en particulier sur le gène *SORL1*, codant pour la protéine transmembranaire *SORLA* car elle a été une protéine d'intérêt dans mes travaux de thèse. Cette protéine est impliquée dans le transport intracellulaire de l'APP, permettant à la fois de réduire la production d' $A\beta$ mais également de favoriser sa dégradation. Le mécanisme détaillé sera présenté dans la partie **2.3.2 Importance de la protéine *SORLA***. L'association génétique entre *SORLA* et la MA semble à ce jour bien établie mais les données génétiques sur

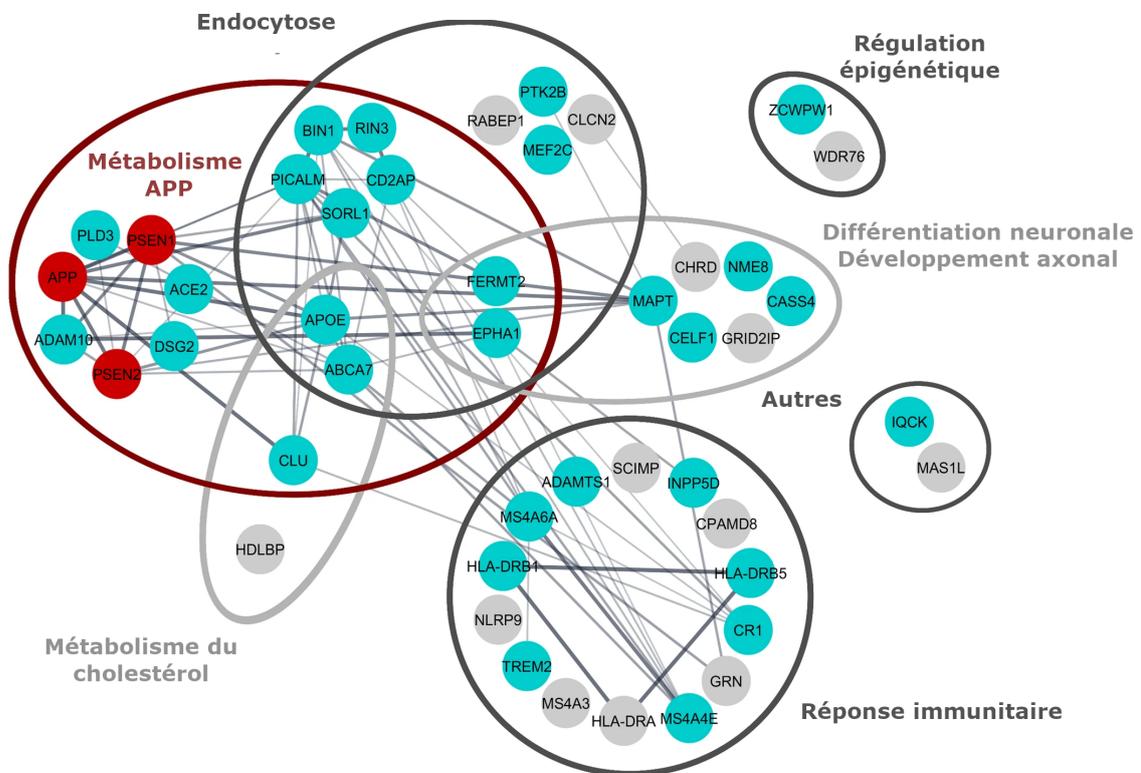


Figure 1.4.: Facteurs de risques génétiques associés à la MA et mécanismes cellulaires impliqués

Schéma montrant les facteurs de risques génétiques associés à la MA et regroupés en fonction de leur implication dans divers processus cellulaires. Sont indiqués en rouge les protéines associées aux FAD, en bleu les protéines associées à un risque fort de développer la MA (sAD) et en gris les facteurs qui sont soupçonnés d'être impliqués mais qui doivent être validés. Les différents processus cellulaires sont délimités par des cercle et les traits indiquent les interactions plus ou moins fortes entre chaque protéine. (Source : VAN ACKER et al., 2019)

SORLA sont complexes. Au moins 6 polymorphismes nucléotidiques (SNP)⁵ ont été démontrés comme étant des facteurs de risque, dont la majorité induit des pertes de fonction. D'autre part, les niveaux protéiques de *SORLA* semblent diminués dans certains cas sporadiques (SCHERZER et al., 2004) alors qu'aucun changement n'a été relaté pour les cas familiaux liés à l'*APP* ou aux *PSEN1/PSEN2*. Cette variation, au sein même des cas sporadiques, expliquent que les études visant à étudier *SORLA* comme biomarqueur pour la MA se soient révélées non-conclusives.

Les mutations sur l'*APP* ou sur les présénillines 1 et 2, affectant la production d' $A\beta$ et entraînant systématiquement le développement de la maladie d'Alzheimer, met en exergue un rôle central de l' $A\beta$. De plus, bien qu'elles ne représentent qu'une petite partie des cas, les formes familiales ont permis d'obtenir la majorité des connaissances que nous avons aujourd'hui sur la pathologie d'un point de vue mécanistique, notamment grâce au développement de modèles animaux. Cependant, comprendre les mécanismes et les facteurs de risques/protecteurs impliqués dans les formes sporadiques apparaît aujourd'hui comme une priorité.

1.4 Les aspects cliniques

Au fil des années, la meilleure connaissance des symptômes, des marqueurs histopathologiques et des mécanismes physiopathologiques associés à la maladie d'Alzheimer, ont permis de mettre au point des moyens de diagnostic et des médicaments pour soigner la maladie. Le diagnostic est basé sur la combinaison de plusieurs indices cognitifs et biologiques, permettant de valider ou d'écarter la suspicion de MA. Les chiffres relatifs au diagnostic, indiquant 1 nouveau cas diagnostiqué toute les 3 minutes en France montrent à nouveau l'ampleur de la maladie dans notre société (France Alzheimer).

5. variation génétique d'une seule paire de bases entre individus d'une même espèce. La sous- ou sur-représentation de ces SNP suggère l'association de ce variant avec la maladie

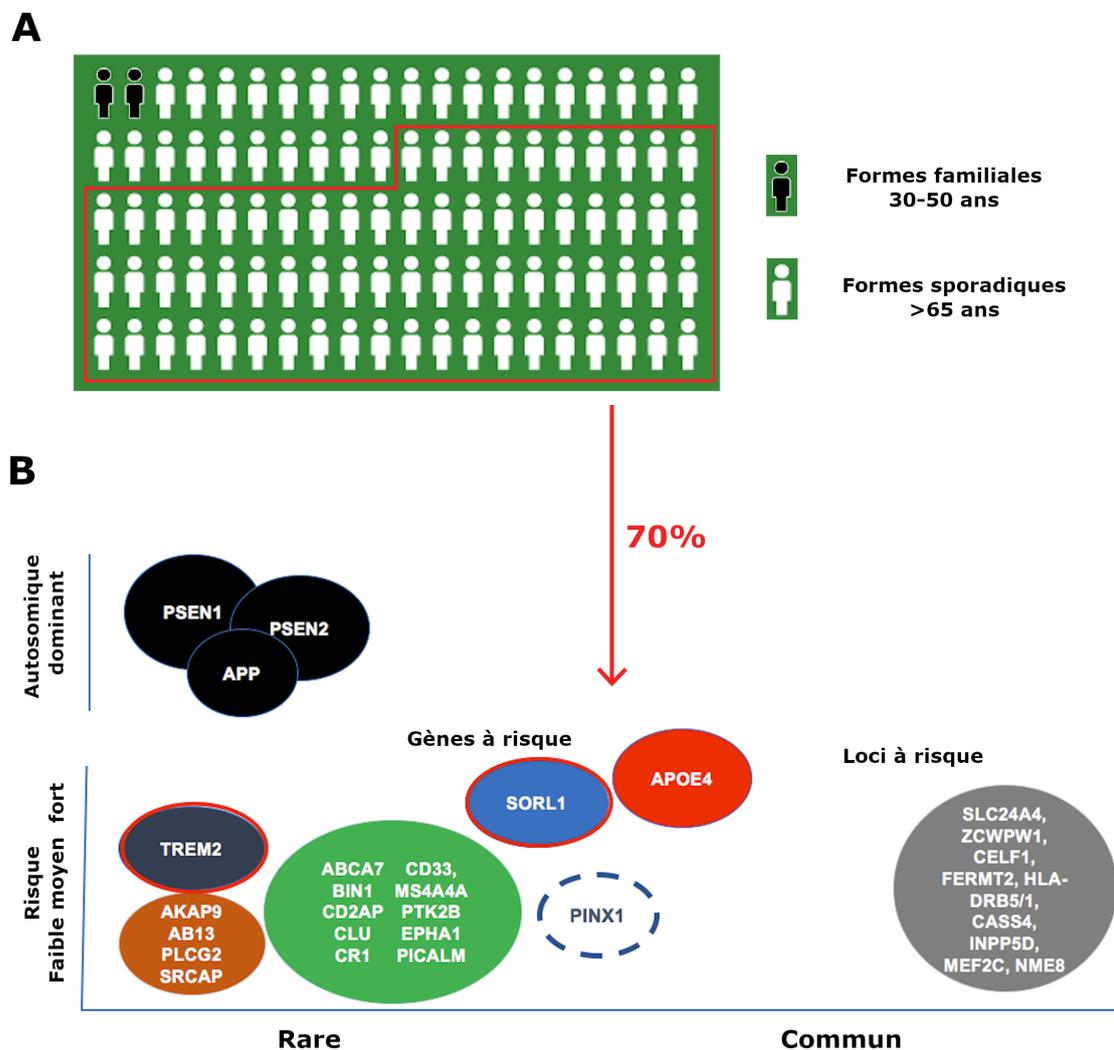


Figure 1.5.: Gènes associés au développement de la MA

(A) Représentation des formes familiales et des formes sporadiques dans la population générale. La part génétique interviendrait dans environ 70% des cas sporadiques (B) Gènes conduisant aux FAD (transmission autosomique dominante) et gènes associés à un risque plus ou moins fort de développer une sAD (axe horizontal). L'axe vertical indique la répartition des gènes dans la population (rare ou commun) (Alzforum)

1.4.1 Diagnostic – Une maladie complexe

Les premières altérations dans le cerveau associées à la MA commencent 20 ans voire plus, avant l'apparition des premiers symptômes. En ce sens, le diagnostic est généralement posé à un stade déjà avancé de la maladie. Habituellement, le diagnostic s'effectue en plusieurs étapes, permettant de renforcer petit à petit le verdict final donné au patient. Dans un premier temps, une évaluation fonctionnelle est réalisée ayant pour but d'identifier de potentiels troubles cognitifs en rapport avec les activités de la vie quotidienne. S'en suit une évaluation cognitive à l'aide de tests neuropsychologiques : le test le plus courant est le Mini-Mental State Examination (MMSE), publié pour la première fois par le Dr Folstein (1975). Ce questionnaire testant l'attention, le calcul, l'apprentissage, le rappel, l'orientation et le langage donne lieu à un score, permettant d'orienter ou non vers le diagnostic de la démence. S'il y a suspicion de MA, une évaluation paraclinique est effectuée et constitue en l'analyse des biomarqueurs⁶ de la MA.

Les biomarqueurs dans le LCR Le liquide céphalo-rachidien (LCR), obtenu par ponction lombaire, est le liquide dans lequel baignent le cerveau et la moelle épinière : son contenu renseigne donc sur les éventuels changements qui peuvent se produire au niveau du cerveau. **Dans le cas de la MA, trois biomarqueurs sont mesurés dans le LCR par technique ELISA : le peptide $A\beta_{42}$, la protéine Tau totale (T-Tau) et la protéine Tau phosphorylée (P-Tau) sur la thréonine 181** (BLENNOW et ZETTERBERG, 2018). Le profil biochimique associé à une suspicion de maladie d'Alzheimer est une augmentation des niveaux de protéines Tau totale et phosphorylée et une baisse des niveaux d' $A\beta_{42}$, du fait de sa séquestration au niveau des plaques séniles dans le cerveau. Une étude plus récente montre néanmoins que le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ est un meilleur biomarqueur que l' $A\beta_{42}$ seul (JANELIDZE et al., 2016) (voir Figure 1.6). Enfin, l'analyse des biomarqueurs est généralement accompagnée d'analyses de sang et d'urine, pour écarter tout autre pathologie pouvant présenter des variations similaires de ces protéines.

6. paramètres biochimiques ou anatomiques, qui sont mesurables objectivement et qui sont les indicateurs d'un processus physiologique normal ou pathologique. Ils sont comme des indices sur une scène de crime, où le coupable s'appelle maladie d'Alzheimer.

Les biomarqueurs par neuro-imagerie Différentes méthodes d'imagerie sont utilisées pour observer les marqueurs directement dans le cerveau comme l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM) et la Tomographie par Émission de Positons (TEP) (voir [Figure 1.6](#)). La première permet de détecter l'atrophie du cerveau, notamment au niveau de l'hippocampe, alors que la seconde permet l'observation des plaques séniles (PiB TEP) (NORDBERG et al., 2010) ainsi que l'hypométabolisme (TEP-FDG) (LA JOIE et al., 2013 ; BRASKIE et THOMPSON, 2013). En effet, une réduction progressive du métabolisme du glucose a été observée chez les patients Alzheimer (KADIR et al., 2012). Plusieurs équipes ont aussi développé une technique permettant de détecter les enchevêtrements neurofibrillaires de Tau par PET mais cet outil n'est utilisé qu'en recherche pour le moment (BROSCH et al., 2017 ; SAINT-AUBERT et al., 2017 ; VILLEMAGNE et OKAMURA, 2016 ; VILLEMAGNE, 2018).

Système "A / T / N" Pour assurer une bonne spécificité du diagnostic, l'équipe du Dr Dubois a récemment mis en place le système "A / T / N" pour Amyloïde, Tau et Neurodégénérescence, qui est un schéma de classification sans biais pour les biomarqueurs de la maladie d'Alzheimer (JACK et al., 2016). Ce schéma semble donc être la marche à suivre pour le diagnostic des patients.

Ces biomarqueurs apparaissent donc comme des outils très importants, permettant avant tout de détecter précocement la maladie mais également de suivre la progression de la maladie ou de valider l'efficacité d'un traitement lors des essais cliniques.

1.4.2 Approches thérapeutiques – Une maladie incurable

Bien qu'il soit souvent tardif, le diagnostic de la maladie d'Alzheimer est essentiel pour accompagner le patient, aussi bien d'un point de vue médical que financier. Il n'existe néanmoins aucun traitement curatif pour la MA, autrement dit aucun médicament anti-Alzheimer permettant de stopper et réverser la maladie. Les traitements actuels, dit symptomatiques, vont donc jouer sur les symptômes associés à la maladie comme les déficits cognitifs, les troubles de l'humeur et du comportement.

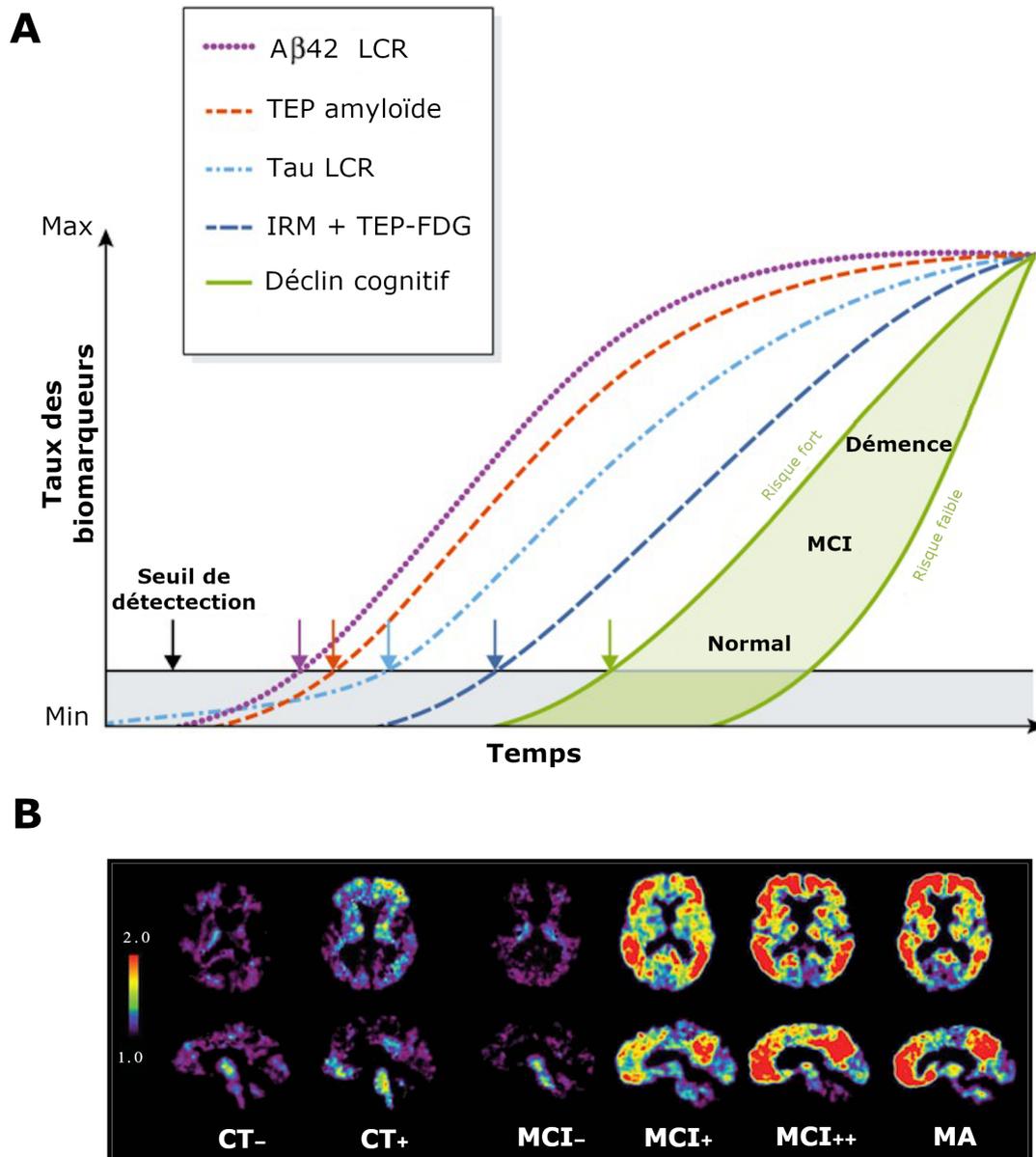


Figure 1.6.: Évolution des biomarqueurs et des troubles cognitifs au cours de la MA
(A) Les biomarqueurs associés à la MA apparaissent progressivement au cours du temps et sont détectables dans la phase pré-clinique soit dans le LCR, soit en imagerie en fonction du stade de la maladie. La ligne horizontale noire indique le niveau de détection de chaque marqueur. Les capacités cognitives sont représentées par les courbes vertes, avec les stades associés en fonction du degré d'altération. **(B)** Exemple de profils obtenus en PiB PET, montrant le niveau des dépôts amyloïdes en fonction des stades. CT = contrôle, MCI = altérations cognitives modérées, MA = maladie d'Alzheimer (Sources : JACK et al., 2013 ; JOHNSON et al., 2012)

Les approches actuelles Aujourd'hui, 4 médicaments pour la MA disposent d'une Autorisation de Mise sur le Marché (AMM) et sont utilisés depuis les années 1990. Ces médicaments appartiennent à deux classes thérapeutiques différentes : les inhibiteurs des acétylcholinestérases et un antagoniste des récepteurs NMDA. Néanmoins, l'utilisation de ces médicaments anti-Alzheimer a largement été remise en cause par la Haute Autorité de Santé (HAS) ces dernières années, en raison de leur efficacité limitée et de leur nombreux effets indésirables qu'ils engendrent (digestifs, cardiaques, neuropsychiques), ce qui a conduit à leur déremboursement en août 2018 en France. Pour ces raisons, l'accent est aujourd'hui porté d'une part, sur le développement de traitements non-médicamenteux dont le but est de stimuler l'activité cérébrale et physique des patients, et d'autre part, sur la recherche de nouvelles approches thérapeutiques, qui a été l'un de mes axes de recherche pendant mon projet de thèse dans un but fondamental pour le moment.

Remarque 5 : médicaments actuels pour la MA

Les 4 médicaments ont pour but de restaurer des taux normaux de neurotransmetteurs au niveau de la fente synaptique.

- **inhibiteurs des acétylcholinestérases** : Donépézil (ARICEPT), Rivastigmine (EXELON) et Galantamine (RAZADINE).

Les patients Alzheimer présentent des taux anormalement bas d'acétylcholine (Ach), dus à une perte des neurones cholinergiques. L'intérêt de ces médicaments est de bloquer l'enzyme en charge de sa dégradation. Cependant, ces médicaments ne sont efficaces que s'il y a encore synthèse et libération de l'Ach, c'est pour quoi ils sont prescrits à des stades légers à modérés, devenant inefficaces quand la neurodégénérescence est trop importante.

- **antagoniste non-compétitif des récepteurs NMDA** : Mémantine (NAMENDA).

Les patients Alzheimer présentent des taux anormalement élevés de glutamate, ce qui entraîne l'hyperstimulation des récepteurs NMDA. Bloquer ces récepteurs *via* un antagoniste a donc pour but d'empêcher l'action toxique du glutamate en excès (exitotoxicité).

Ces deux types de traitement semblent présenter des mécanismes d'action complémentaires, sous-entendant la possibilité d'une prescription simultanée.

(Alzforum)

Les nouvelles stratégies thérapeutiques En 2019, 1776 essais cliniques en lien avec la MA, en cours ou terminés, ont été répertoriés sur le site (Clinical trials) et dont une quarantaine sont actuellement en phase 3 d'étude. Les nouvelles approches testées ciblent majoritairement le peptide A β et visent (1) à réduire sa production (inhibiteurs de la β ou γ -sécrétase) ou (2) son agrégation (anti-agrégants), (3) à augmenter sa clairance (avec la néprylisine) ou (4) à le bloquer

directement (immunothérapies actives ou passives) (FOLCH et al., 2016). Des approches cherchent également à augmenter de façon plus large la dégradation des protéines agrégées dans la maladie, *via* l'activation l'autophagie. Cet aspect sera détaillé dans la partie [5.2 Cibler l'autophagie](#). Enfin, des approches plus innovantes sont également à l'étude, comme la stimulation profonde du fornix de façon comparable à la simulation réalisée chez les patients parkinsoniens (LEPLUS et al., 2019; FONTAINE et al., 2013; LOZANO et al., 2016; PONCE et al., 2016). Malheureusement, la majorité des essais cliniques visant les aspects décrits ci-dessus a échoué alors qu'une petite partie est encore en cours d'analyse. Les raisons de l'échec des inhibiteurs de la β et γ -sécrétases seront discutés dans la partie [IV Discussion et perspectives](#), comme l'intérêt de cibler l'autophagie dans la MA.

Aujourd'hui, la combinaison de plusieurs biomarqueurs permet un diagnostic fiable de la maladie d'Alzheimer. Cependant, c'est un processus long reposant sur des techniques invasives (collecte du LCR) et onéreuses (imageries). Il est donc nécessaire de mettre au point de nouvelles méthodes de détection des biomarqueurs (analyse sanguine) et surtout de développer un diagnostic plus précoce. D'autre part, des moyens colossaux, financiers et humains, ont été déployés ces dernières années pour le développement de nouvelles thérapies, en vain. Il est donc important de comprendre la raison de ces échecs et d'envisager de nouvelles cibles thérapeutiques et/ou de combiner les approches thérapeutiques.

Maturation physiopathologique de l'APP

La recherche sur la maladie d'Alzheimer oppose souvent deux camps : les baptistes et les tauistes. Mon équipe d'accueil a choisi de se ranger du côté des baptistes et d'étudier la voie de l'APP conduisant au peptide amyloïde, le composant majeur des plaques séniles. Au cours de mon projet de thèse, je me suis intéressée, non pas à l'A β qui est au centre de la majorité des études, mais à son précurseur direct appelé le fragment β -CTF ou C99. Que ce soit l'A β ou le C99, ces fragments sont produits lors du catabolisme de l'APP par la voie dite amyloïdogénique.

2.1 Le précurseur du peptide amyloïde (APP)

2.1.1 Structure – Une protéine transmembranaire de type I

Après l'identification du peptide amyloïde, le gène *APP* fut le premier à être cloné en 1987 puis incriminé dans les FAD (GOLDGABER et al., 1987; KANG et al., 1987; TANZI et al., 1987). Chez l'Homme, ce gène est situé sur le chromosome 21 et son expression est extrêmement conservée au cours de l'évolution (THARP et I. N. SARKAR, 2013). Il est fortement exprimé dans le système nerveux central (SNC) et dans de nombreux types cellulaires dont les neurones, les cellules gliales ou les cellules endothéliales. Ce gène contient 18 exons, la séquence de l'A β étant codée par les exons 16 et 17 (YOSHIKAI et al., 1990). Différents épissages alternatifs de ce gène conduisent à la production de plusieurs isoformes de l'APP, de taille variable et dont l'expression différencie en fonction des organes. **Celles exprimées dans le SNC et contenant la séquence du peptide A β sont l'APP770, l'APP751**

et l'APP695, cette dernière étant l'isoforme majoritairement exprimée dans les neurones (voir [Figure 2.1](#)). L'isoforme APP695 est également celle exprimée dans les souris 3xTgAD, comportant en plus la mutation suédoise. Chez la souris, le gène *APP* est situé sur le chromosome 16 et sa séquence diffère de celle de l'Homme notamment au niveau de la séquence correspondant à l'A β : la différence de 3 acides aminés à ce niveau (R676G, Y681F et H684R) modifie les propriétés d'agrégation du peptide A β , l'A β n'étant pas capable de s'agréger chez la souris (voir [Figure 2.1](#)). Cette caractéristique explique l'utilisation de l'APP humanisé dans l'ensemble des modèles murins de la MA.

La protéine APP appartient à la famille des glycoprotéines transmembranaires de type I. Elle est constituée (1) d'un long domaine extracellulaire en N-terminal dont la longueur varie en fonction des isoformes, (2) d'un domaine transmembranaire hydrophobe contenant la séquence de l'A β et (3) d'un court domaine intracellulaire C-terminal. De façon simplifiée, l'ectodomaine est lui-même constitué de deux domaines principaux appelés E1 et E2, impliqués dans son interaction avec un certain nombre de protéines, lui conférant ainsi des fonctions physiologiques particulières. La partie C-terminale contient, elle, plusieurs motifs d'adressage vers les différents compartiments subcellulaires, contrôlant ainsi son transport et son métabolisme (voir [2.3 Le trafic intracellulaire](#) et [Figure 2.1](#)). Enfin il existe également deux protéines homologues à l'APP, appelées APLP 1 et APLP 2 (APP-like proteins) chez les mammifères. Elles possèdent une structure similaire à l'APP, sont métabolisées par les mêmes sécrétases (voir [2.2 Les voies de clivage](#)) mais sont dépourvues de la séquence de l'A β . La structure de ces différentes protéines est représentée de façon schématique dans la [Figure 2.1](#).

(revue intéressante : O'BRIEN et P. C. WONG, 2011)

La dimérisation de l'APP Plusieurs études ont montré que l'APP peut dimériser *in vitro* et *in vivo* et ce phénomène jouerait un rôle essentiel dans la synaptogenèse (BAUMKÖTTER et al., 2014). L'homodimérisation ou hétérodimérisation de l'APP avec APLP 1 ou APLP 2 ferait intervenir deux régions particulières de sa structure : une située dans son ectodomaine et l'autre dans le domaine transmembranaire. Plus précisément, des études montrent que l'APP dimérise grâce aux domaines E1 et E2, bien que le domaine E1 jouerait un rôle majoritaire permettant une interaction plus forte. Cette dimérisation est également stabilisée par la formation de ponts disulfures en N-terminal (ROSSJOHN et al., 1999 ; DAHMS et al., 2010). D'autre part, le

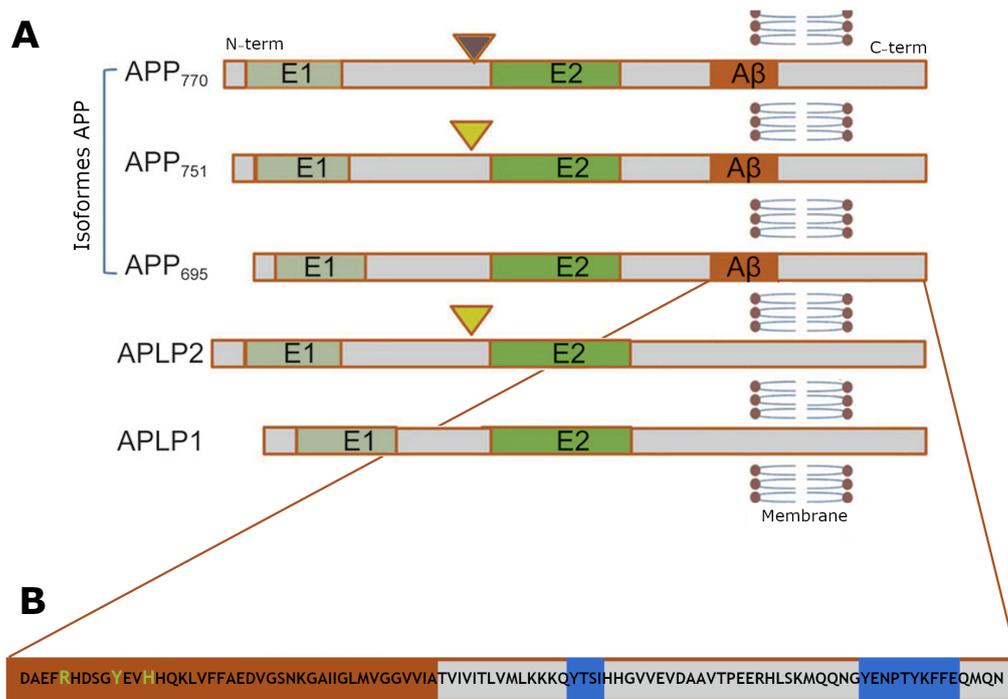


Figure 2.1.: Structure de l'APP et de ses homologues

(A) Structure des 3 isoformes de l'APP et de ses homologues (APLP1 et APLP2) représentées à la membrane. Sont indiquées les régions E1 et E2 ainsi que la localisation du domaine inhibiteur de protéase (KPI) (en jaune) et du domaine OX-2 (en marron : OX2 + KPI). La présence ou non de ces deux domaines conditionne la nature de l'isoforme. (B) Séquence humaine correspondant à la partie C-terminale de l'APP (aussi appelée C99). La séquence de l'Aβ est représentée en marron et les motifs pour l'adressage de l'APP dans la cellule (YTSI, YENPTY, YKE) en bleu et sont indiqués en vert les acides aminés qui diffèrent chez la souris. (Source : CHEN et al., 2017)

domaine transmembranaire contient également 3 motifs GXXXG qui favoriseraient ou renforceraient cette dimérisation par interaction hélice-hélice (voir [Figure 2.2](#)). Il est important de noter que ces mêmes motifs sont aussi présents sur la séquence de certains de ses catabolites, dont le fragment C99 et l'A β (MUNTER et al., 2007 ; KIENLEN-CAMPARD et al., 2008). Cependant, le rôle exact de ces motifs dans la dimérisation de l'APP reste controversé, tout comme son effet sur le métabolisme de l'APP et la génération d'A β . Cet aspect sera discuté dans la partie [IV Discussion et perspectives](#). Enfin, cette capacité à dimériser confère à l'APP une caractéristique commune avec la famille des récepteurs membranaires (LEMMON et SCHLESSINGER, 2010).

2.1.2 Fonctions – Une protéine physiologique

Bien que la structure et les domaines qui constituent l'APP soient bien décrits, les fonctions précises de cette protéine restent à approfondir. Il est d'ailleurs très compliqué de faire un résumé de ses fonctions, tant la littérature à ce sujet est vaste et divergente. Néanmoins, l'étude des souris invalidées pour le gène de l'APP (H. ZHENG et al., 1995) a permis d'apporter des informations importantes concernant les potentiels rôles physiologiques de cette protéine. Tout d'abord, ces animaux sont viables et ne présentent que quelques altérations de poids (corporel et cérébral) et de loco-motricité dans les premières semaines de vie. Ce phénotype subtil s'explique probablement par une compensation, relayée par ses homologues, APLP 1 et APLP 2, qui restent exprimées dans ce modèle. Néanmoins, à un âge plus avancé, ces souris développent des défauts synaptiques et de mémoire, suggérant l'implication de l'APP dans le fonctionnement des circuits neuronaux et la mémorisation. En effet, plusieurs études s'accordent pour dire que, l'APP interviendrait dans plusieurs processus physiologiques du SNC et à différentes périodes de la vie, comme la migration neuronale au cours du développement cérébral ainsi que la neurogenèse, la synaptogenèse, la plasticité synaptique et la neuro-régénération chez l'enfant et l'adulte. De plus, de par ses caractéristiques proches des récepteurs membranaires, elle participerait aussi à plusieurs processus impliqués dans la signalisation cellulaire, comme l'adhésion cellule-cellule, la survie ou la mort cellulaire.

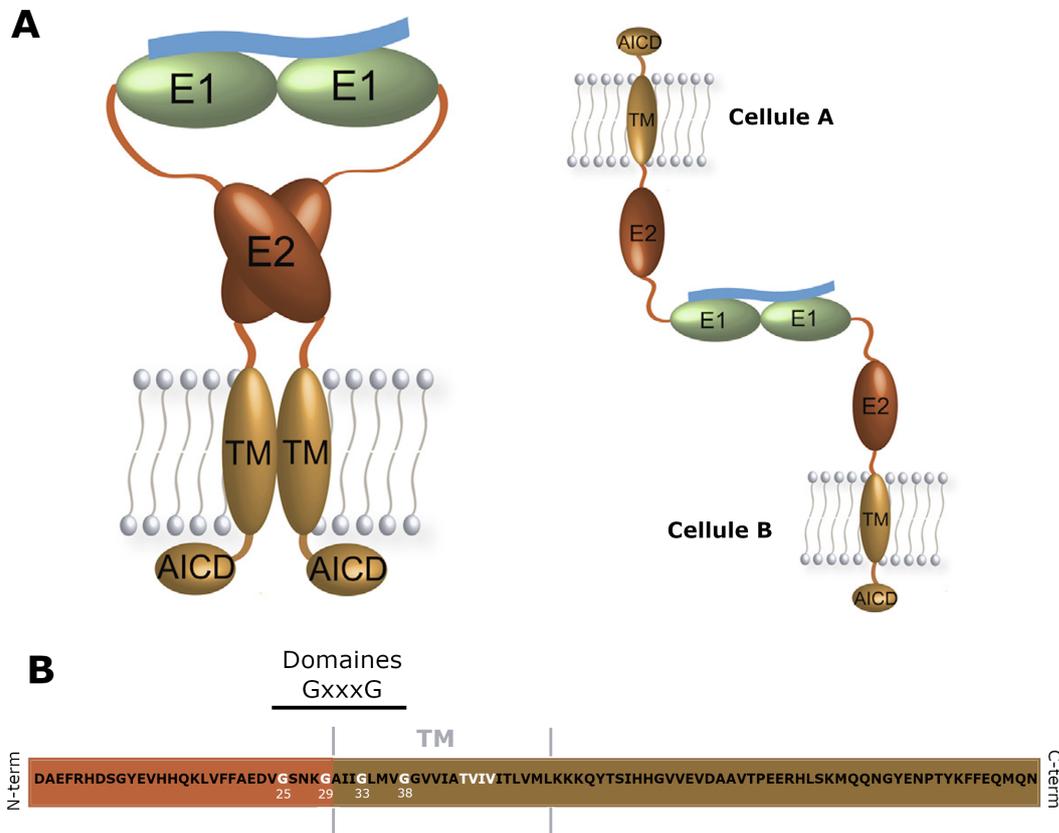


Figure 2.2.: Dimérisation *cis* ou *trans* de l'APP

(A) L'APP et ses homologues peuvent s'homo- ou s'hétéro-dimériser grâce à 3 domaines différents, présents en N-terminal ou dans la région juxtamembranaire. L'interaction *via* le domaine E1 crée des interactions plus fortes que *via* E2. Il peut se former des dimères *cis* (à gauche) ou *trans* (à droite) permettant l'interaction entre deux cellules différentes.

(B) Séquence humaine de la partie C-terminale de l'APP (C99) avec les 3 motifs successifs GxxxG qui participent à la dimérisation de l'APP et du C99. Cette interaction se fait *via* les forces de Van der Waals. Est indiquée en blanc la position des glycines des domaines GxxxG ainsi qu'une séquence plus récemment découverte (TVIV) qui participerait également à la dimérisation du C99. (Source : HOEFGEN et al., 2014)

La connaissance de la structure de l'APP est une notion clé pour comprendre ses fonctions dans la cellule, médiées par son interaction avec un grand nombre de partenaires, mais également pour mieux appréhender son métabolisme et son transport intracellulaire.

2.2 Les voies de clivage

De par sa structure, l'APP mature peut subir une protéolyse intramembranaire régulée (RIP) — pour "Regulated Intramembrane Proteolysis" —, qui nécessite un élagage au préalable de son ectodomaine suivi du clivage intramembranaire de la protéine, conduisant à la libération d'un peptide de petite taille et d'un domaine intracellulaire. Deux protéases différentes peuvent être impliquées dans l'élagage de l'APP, ce qui définit deux voies principales de clivage de l'APP. En condition physiologique, seulement 5 % de l'APP est métabolisé en $A\beta$. Au contraire, **dans le cas de la maladie d'Alzheimer et plus précisément pour certaines formes familiales, il y a une dérégulation de cette balance en faveur de la voie amyloïdogène, conduisant à une production excessive d' $A\beta$** . Ces deux voies sont considérées comme les voies canoniques de l'APP. De nouvelles voies de clivage ont récemment été décrites et complexifient le métabolisme de l'APP. Ces différentes voies se caractérisent par les enzymes impliquées, appelées sécrétases, ainsi que par les métabolites produits.

2.2.1 Description – Voies canoniques et voies alternatives

La voie non-amyloïdogène Cette voie est largement majoritaire en condition physiologique et se caractérise par deux clivages successifs, orchestrés par l' α - puis la γ -sécrétase. Premièrement, l'APP est clivé par la métalloprotéase ADAM10. Cette protéase agissant à pH neutre, elle clive l'APP majoritairement au niveau de la membrane plasmique et est responsable la coupure α -sécrétase générant 2 fragments distincts : (1) un fragment N-terminal sécrété dans le milieu extracellulaire, l'APP α soluble (sAPP α), et (2) un fragment C-terminal et transmembranaire de 83 acides aminés (C83) ou (α -CTF). Le fragment sAPP α a été démontré comme ayant des propriétés neurotrophiques et neuroprotectrices, participant ainsi à la physiologie du neurone. La coupure par l' α -sécrétase se produit dans la séquence

du peptide amyloïde (entre les résidus K16 et L17), ce qui empêche sa formation. Deuxièmement, le fragment C83 est à son tour clivé au niveau de sa partie intramembranaire, par le complexe γ -sécrétase : ce clivage conduit à la formation (3) d'un peptide de 3 kDa (P3) et (4) d'un fragment intracellulaire (AICD). Le peptide P3 correspond à une forme tronquée en N-terminal de l'A β et est aussi appelé A β 17-X, X étant variable en fonction du clivage γ -sécrétase (voir Figure 2.3). Dans la voie non-amyloïdogène, cette deuxième coupure a lieu principalement à la membrane plasmique.

Voie amyloïdogène Bien qu'elle soit associée au processus pathogène de la maladie d'Alzheimer car à l'origine de la production du peptide amyloïde, la voie amyloïdogène a lieu également en condition physiologique, mais elle est minoritaire. De façon similaire à la voie précédente, elle se caractérise par l'action consécutive de deux sécrétases : la β - puis la γ -sécrétase. Elle débute par le clivage β ayant lieu à la membrane plasmique ou des endosomes, après internalisation de l'APP. Ce clivage est exécuté par une aspartyl protéase qui coupe au niveau du N-terminal de l'A β et libère 2 fragments : (1) un fragment N-terminal sécrété dans le milieu extracellulaire ou dans la lumen des endosomes, l'APP β soluble (sAPP β), et (2) un fragment C-terminal de 99 acides aminés (C99) ou (β -CTF), qui est ancré à la membrane. Ce fragment est au cœur de mes travaux de thèse. Dans les neurones, l'activité β -sécrétase est majoritairement portée par la protéine BACE 1 (voir 2.2.2 Caractéristiques des sécrétases). Comme le C83, le C99 subit dans un 2^{ème} temps un clivage par la γ -sécrétase produisant (3) le peptide amyloïde (A β) qui est sécrété dans le milieu extracellulaire ou dans la lumen des endosomes et (4) l'AICD qui se retrouve dans le cytosol (voir Figure 2.3). D'autre part, bien que l' α -sécrétase soit majoritairement associée à la voie non-amyloïdogénique, il a été montré que le C99 peut également être clivé par cette sécrétase, générant ainsi du C83 (JÄGER et al., 2009 ; FLAMMANG et al., 2012) (voir Figure 2.3). Pour une question de simplicité, **nous utiliserons le terme "APP-CTFs" pour désigner le C99 et le C83 dérivé du C99**. Bien entendu, le terme APP-CTF — pour "C-Terminal Fragments" — désigne de façon plus large les fragments C-terminaux générés par les autres voies métabolisant l'APP et également l'AICD.

De plus, le clivage γ -sécrétase n'est pas unique mais le résultat de 3 clivages successifs, qui peuvent conduire à la formation de différentes espèces d'A β allant de 37 à 42 acides aminés (voir 2.2.2 Caractéristiques des sécrétases). En condition

physiologique, la majorité (environ 90%) de l'A β produit est de l'A β_{40} et seulement un petit pourcentage est attribué à l'A β_{42} . En revanche, des mutations sur le gène *APP* proches ou dans le site de clivage des sécrétases sont associées aux FAD et peuvent entraîner une dérégulation de ces ratios, conduisant à une augmentation du niveau total d'A β (cas des mutations au niveau du site β) ou de la concentration des formes les plus agrégeantes comme A β_{42} (cas des mutations au niveau du site α) ou du ratio A β_{42} /A β_{40} (cas des mutations au niveau du site γ). Ces différents phénotypes entraînent le passage d'un « état soluble » à un « état agrégé », ce qui conduit à la formation d'oligomères d'A β puis de fibrilles caractéristiques des plaques amyloïdes. Dans le cas des formes sporadiques, l'accumulation excessive de peptide A β ne semble pas liée à une augmentation de la production mais à une réduction importante de sa clairance, comme nous le verrons dans le chapitre 4 [Défauts de clairance dans la maladie d'Alzheimer](#).

En plus des peptides A β_{40} et A β_{42} (1-40 et 1-42) commençant par une aspartate Asp1, il existe chez les patients Alzheimer de nombreux peptides tronqués au niveau du N- ou du C-terminal de ces formes. Les enzymes responsables de la production de ces peptides et leur implication dans la pathologie ne sont pas encore toutes clairement définies. Un des variants est bien étudié, le pyroglutamate-A β (troncation en N-terminale) car il est hautement amyloïdogénique (NUSSBAUM et al., 2012) Il est intéressant de noter que, contrairement à l'A β_{42} , cette forme a été décrite, à ce jour, uniquement dans des cas de MA. Enfin, des modifications post-traductionnelles du peptide A β (nitration, phosphorylation) peuvent également augmenter sa capacité d'agrégation (KUMAR et WALTER, 2011 ; KUMMER et al., 2011).

Voie de l' η -sécrétase Le métabolisme de l'APP a pendant longtemps été restreint aux voies non-amyloïdogène et amyloïdogène. Cette vision a évolué récemment avec la découverte d'une nouvelle enzyme capable de cliver l'APP : l' η -sécrétase (WILLEM et al., 2015). Son activité est portée majoritairement par la métalloprotéinase MT5-MMP au niveau des neurones (BARANGER et al., 2016). Cette voie semble particulièrement intéressante car elle peut également conduire à la production du peptide A β . D'un point de vue mécanistique, cette sécrétase est comparable à l' α - ou la β -sécrétase, dans le sens où son action entraîne la libération (1) d'un fragment N-terminal soluble, le sAPP- η et (2) d'un fragment C-terminal transmembranaire (CTF- η) ou (C191). Ce CTF peut ensuite rejoindre la voie amyloïdogène ou non

amyloïdogène pour former certains des fragments décrits ci-dessus : son clivage par l' α -sécrétase produit (3) le fragment appelé $A\eta-\alpha$ et du C83 alors que la β -sécrétase génère (4) le fragment $A\eta-\beta$ et du C99. Les APP-CTFs générés peuvent enfin être métabolisés par la γ -sécrétase formant d'un côté, le peptide P3 et l'AICD et de l'autre, le peptide $A\beta$ et l'AICD (voir [Figure 2.3](#)).

À ce jour, le rôle exact de la coupure η -sécrétase de l'APP reste méconnu. Néanmoins, elle semble avoir un rôle physiologique, puisque les fragments solubles $A\eta$ et les fragments CTF- η sont présents dans le cerveau de souris sauvages (WILLEM et al., 2015). D'autre part, elle semble également contribuer à la pathogenèse de la MA comme l'ont proposé le Dr Baranger et collaborateurs. En effet, le croisement de souris Alzheimer avec des souris invalidées pour la MT5-MMP induit une diminution de la charge amyloïde et de la neuroinflammation, ainsi qu'une amélioration des déficits synaptiques (LTP) et de mémoire. De plus, la surexpression de MT5-MMP favorise le trafic de l'APP vers les endosomes, où a lieu principalement la voie amyloïdogène (BARANGER et al., 2016). D'autre part, la protéinase MT5-MMP est fortement exprimée dans les neurites dystrophiques entourant les plaques séniles présentes dans le cerveau de patients Alzheimer en *post-mortem* (SEKINE-AIZAWA et al., 2001). Ces données supportent l'idée que l' η -sécrétase pourrait être une nouvelle cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer.

Autres voies D'autres enzymes ont été décrites comme étant capables de cliver l'APP comme la δ -sécrétase ou plus hypothétiquement les cathepsines, mais ces voies ne seront pas détaillées dans ce manuscrit.

2.2.2 Caractéristiques des sécrétases – Focus sur la voie amyloïdogène

Les sécrétases impliquées dans les voies canoniques de l'APP ont été largement décrites, quant à leur expression sub-cellulaire et tissulaire, les protéases portant leur activité et leur structure. Une caractéristique très importante de ces sécrétases est leur localisation dans la cellule, car elle va conditionner la nature des fragments de l'APP produits. J'ai choisi de détailler uniquement les caractéristiques des deux sécrétases impliquées dans la production du C99, la β - et la γ -sécrétase.

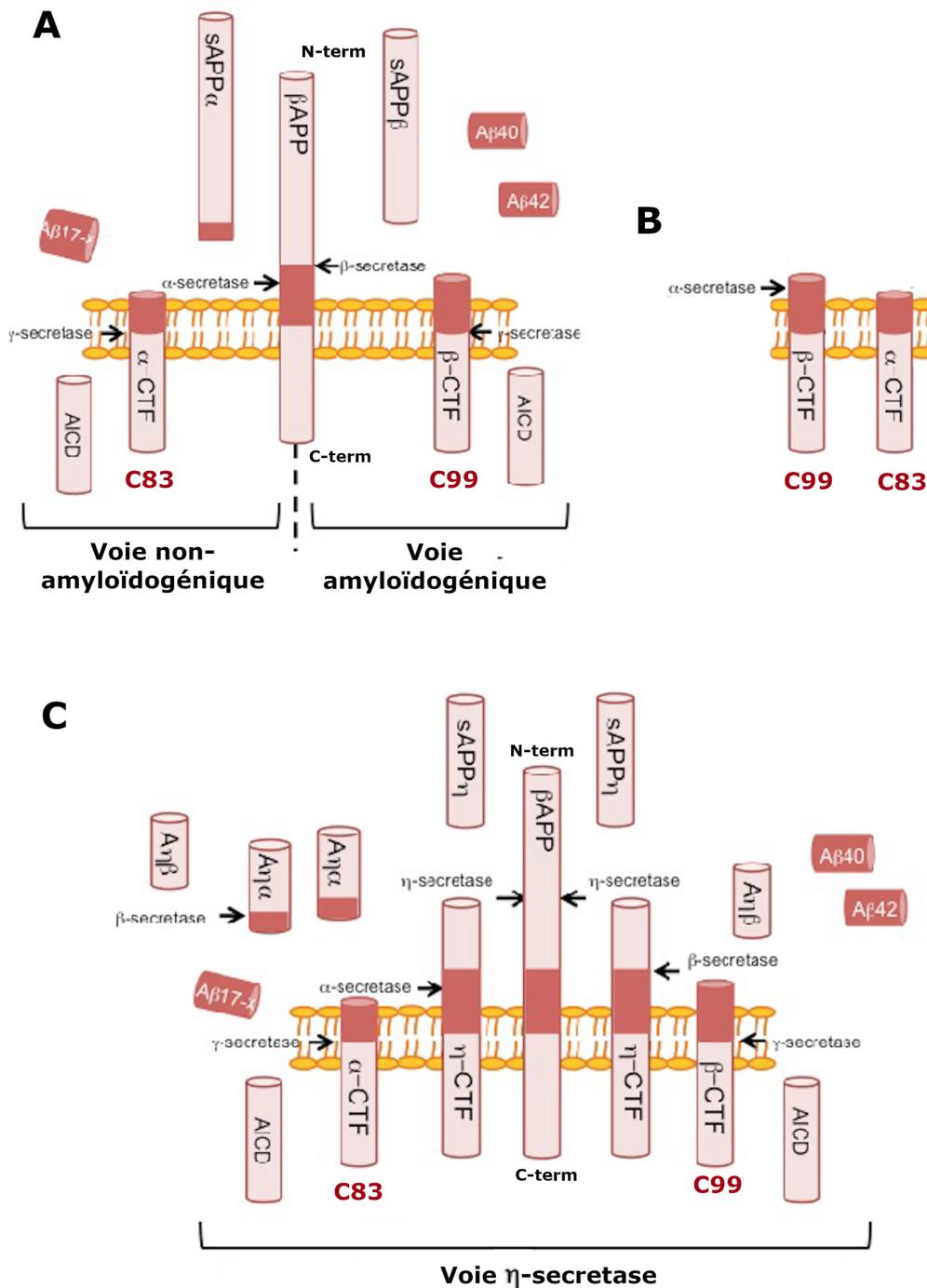


Figure 2.3.: Voies de clivage canoniques et alternatives de l'APP

(A) Voies canoniques de l'APP : voie non-amyloïdogénique et voie amyloïdogénique. Ces deux voies se distinguent par les sécrétases impliquées et par la nature des fragments générés. Seule la voie amyloïdogénique conduit à la production d'Aβ. Le C99, qui est le fragment d'intérêt pour mon projet, est une protéine transmembranaire et obtenue après clivage de l'APP par la β-sécrétase. (B) Le fragment C83, associé à la voie non-amyloïdogénique, peut aussi être généré après clivage du C99 par l'α-sécrétase. (C) Voie alternative de l'APP : voie η-sécrétase. Elle conduit *in fine* à la génération des mêmes fragments que les voies canoniques, exceptés les fragments solubles sAPPα et sAPPβ. (Source DUNYS et al., 2018)

β -sécrétase Cette coupure constitue l'étape limitante dans la production du peptide $A\beta$.

Localisation Son activité étant maximale à pH acide (pH 4,5), elle est retrouvée majoritairement au niveau des vésicules post-golgiennes et des endosomes, et en moindre mesure à la membrane plasmique (VASSAR et al., 1999; RAJENDRAN et al., 2006).

Site catalytique Il est aujourd'hui connu que l'activité β -sécrétase est portée par deux protéines homologues : BACE 1 (aussi appelée Asp 2 ou mémapsine 2) et BACE 2 (aussi appelée Asp1 ou mémapsine 1) — pour " β -site APP cleaving enzyme" —. Ces protéases à aspartate appartiennent à la famille des protéines transmembranaires de type I et leur site catalytique est situé dans leur domaine N-terminal extracellulaire.

La première à avoir été découverte est BACE1, par 4 équipes indépendantes au cours de la même année. Elle est considérée comme la principale enzyme en charge du clivage β -sécrétase de l'APP (VASSAR et al., 1999; R. YAN et al., 1999; SINHA et al., 1999; HUSSAIN et al., 1999). BACE1 a été décrite comme étant capable de cliver l'APP à deux endroits distincts dans sa séquence : soit au niveau de l'acide aspartique en position 1 d'après la séquence de l' $A\beta$ (Asp1), soit au niveau de l'acide glutamique en position 11 (Glu11). Ce second clivage est aussi appelé β' -sécrétase. Par conséquent, **uniquement la coupure en Asp1 (site β) conduit à la formation du C99 et donc la production d' $A\beta$** . Cependant, la coupure Glu11 (site β') reste celle majoritaire en condition physiologique et génère un fragment de 89 acides aminés (C89) ainsi qu'une forme tronquée de l' $A\beta$, l' $A\beta_{11-X}$ ou $A\beta'$, où X varie en fonction de la coupure γ -sécrétase. Plusieurs années après la découverte de BACE1, son homologue BACE2 a été identifié et présente environ 71 % d'homologie avec la première chez l'Homme (ACQUATI et al., 2000; SOUTHAN et HANCOCK, 2013). BACE 2 (situé sur le chromosome 21) est peu exprimé dans le cerveau en comparaison à BACE1, BACE1 est donc la forme majoritaire dans les neurones (BENNETT et al., 2000; HOLLER et al., 2012; LAIRD et al., 2005). De plus, BACE 2 ne contribue pas à la production d' $A\beta$, car elle coupe l'APP dans la séquence de l' $A\beta$, générant ainsi le fragment C80 (FARZAN et al., 2000).

Pour être active, BACE 1 doit subir différentes modifications post-traductionnelles. La première étape consiste en le clivage du propeptide par des furines du réseau trans-golgien, nécessitant au préalable l'homodimérisation de BACE 1. Elle est suivie

de la glycosylation de 2 résidus aspartates impliqués dans l'activité catalytique et enfin la formation de 3 ponts disulfures. Ces ponts disulfures marquent la différence avec les autres protéases à aspartate et confèrent la spécificité de cette enzymes pour l'APP (HANIU et al., 2000 ; HUNT et TURNER, 2009). Cependant, une étude plus récente montre que ces modifications ne seraient en réalité pas nécessaires à son activité catalytique (Y. YAN et al., 2017).

Dans la MA Certaines mutations associées aux FAD, comme la mutation suédoise (K670N/M671L) qui se situe près du site β , entraîne un changement du ratio de l'activité β -sécrétase (β'/β), en faveur du clivage au niveau de l'Asp1. Ces mutations favorisent donc la production du C99 et de l'A β (DENG et al., 2013 ; FARZAN et al., 2000). BACE 1 a également une meilleur affinité pour la forme suédoise, permettant la coupure de l'APP aussi dans la voie sécrétoire (HAASS et al., 1995) alors que l'APP sauvage est, comme décrite ci-dessus, majoritairement clivée dans les endosomes. Au contraire, la mutation islandaise (A673T), récemment découverte et protectrice contre la MA, va favoriser le clivage β' augmentant ainsi la formation du C89 et limitant celle de l'A β (JONSSON et al., 2012). D'autre part, chez certains patients Alzheimer, l'activité et ses niveaux d'expression cérébraux de BACE1 sont augmentés, indiquant un rôle clé de la β -sécrétase dans la MA via la dérégulation du catabolisme de l'APP (L.-B. YANG et al., 2003). Toutefois aucune mutation de BACE 1 n'a été à ce jour corrélée à la MA. Ces altérations de la β -sécrétase chez les patients Alzheimer ont conduit à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques utilisant des inhibiteurs de la β -sécrétase.

Cette stratégie se heurtent à plusieurs difficulté : (1) l'absence de spécificité entre BACE 1 et BACE 2, (2) l'absence de spécificité aussi entre BACE 1 et la cathepsine D, qui est aussi une aspartyl protéases et (3) des problèmes plus techniques liés au développement de molécules ayant une efficacité suffisante et une bonne pénétrance à travers de la BHE, mais aussi de la membrane plasmique pour agir au niveau des endosomes. L'ensemble de ces aspects seront discutés dans la partie **IV Discussion et perspectives**. Enfin, il est important de garder à l'esprit que BACE 1, comme BACE 2, possède de nombreux substrats en plus de l'APP. Pour BACE 1, il y a par exemple les protéines homologues à l'APP, **APLP1** et **APLP2**, la protéine **NRG1** — pour "Neuregulin-1" — impliquée dans l'adhésion cellulaire, le récepteur au LDL, **LDLR** — pour "Low Density LipoProtein Receptor" —, impliqué dans l'endocytose du LDL ou la protéine **Sez6** — pour "Seizure Protein 6" — impliquée dans la connectivité neuronale (DE STROOPER et al., 2010 ; R. YAN, 2017) . **De façon intrigante, le**

C99 semble être un des seuls fragments produits par BACE 1 n'ayant pas de rôle physiologique, et au contraire plutôt toxique. Les substrats de BACE 2 sont plutôt localisés dans les organes périphériques, comme la protéine PMEL — pour "Melanocyte Protein" — impliquée dans la pigmentation cellulaire (ROCHIN et al., 2013) et la TMEM27 — pour "TransMEMbrane protein 27" —, une protéine importante pour la régulation des cellules β -pancréatiques (ESTERHÁZY et al., 2011).

En conclusion, le clivage par ces aspartyl protéases joue donc un rôle très important en condition physiologique, *via* la fonction de leurs substrats ainsi, leur inhibition ou celle de la cathepsine D (induite indirectement) peut entraîner des effets très néfastes. Les similarités entre ces différentes aspartyl sécrétase pose une grande difficulté pour cibler spécifiquement le clivage de BACE1 sur l'APP.

γ -sécrétase Elle est responsable de la protéolyse intramembranaire des APP-CTFs et est commune aux 2 voies canoniques. Dans la voie amyloïdogénique, elle va conditionner la nature du peptide $A\beta$.

Localisation Cette activité est retrouvée soit au niveau de la membrane plasmique où elle intervient après la coupure α -sécrétase (sur C83), soit au niveau des endosomes et lysosomes après la coupure β -sécrétase (sur C99). De plus la partie C-terminale de l' $A\beta$ étant ancrée dans la membrane, cette activité s'effectue dans un environnement hydrophobe, théoriquement hostile à l'hydrolyse.

Site catalytique Contrairement à l' α et la β -sécrétase dont l'activité est portée par une seule protéine, **la γ -sécrétase est un complexe multiprotéique composé de 4 protéines transmembranaires différentes** : (1) la protéine PEN2 — pour "Presenilin Enhancer 2" — (2) la nicastrine (3) la protéine Aph1 — pour "Anterior Pharynx Defective 1" — dont il existe deux isoformes chez l'Homme, Aph1a et Aph1b et (4) la préséniline 1 ou 2 (**PS1 ou PS2**), qui constitue la sous-unité catalytique du complexe. Avec les 2 isoformes des PS et d'Aph1, 4 complexes différents au total peuvent être formés chez l'Homme (YONEMURA et al., 2016). Chez la souris, il existe 3 isoformes d'Aph1 (Aph1c en plus), augmentant la possibilité théorique de 6 complexes différents. La formation de ce complexe nécessite un assemblage séquentiel décrit dans la **Figure 2.4**.

Comme évoqué précédemment, **la coupure dite γ -sécrétase correspond en réalité à 3 clivages successifs, aboutissant à la production des peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$** . Ces clivages résultent de l'activité endopeptidase et carbopeptidase de la

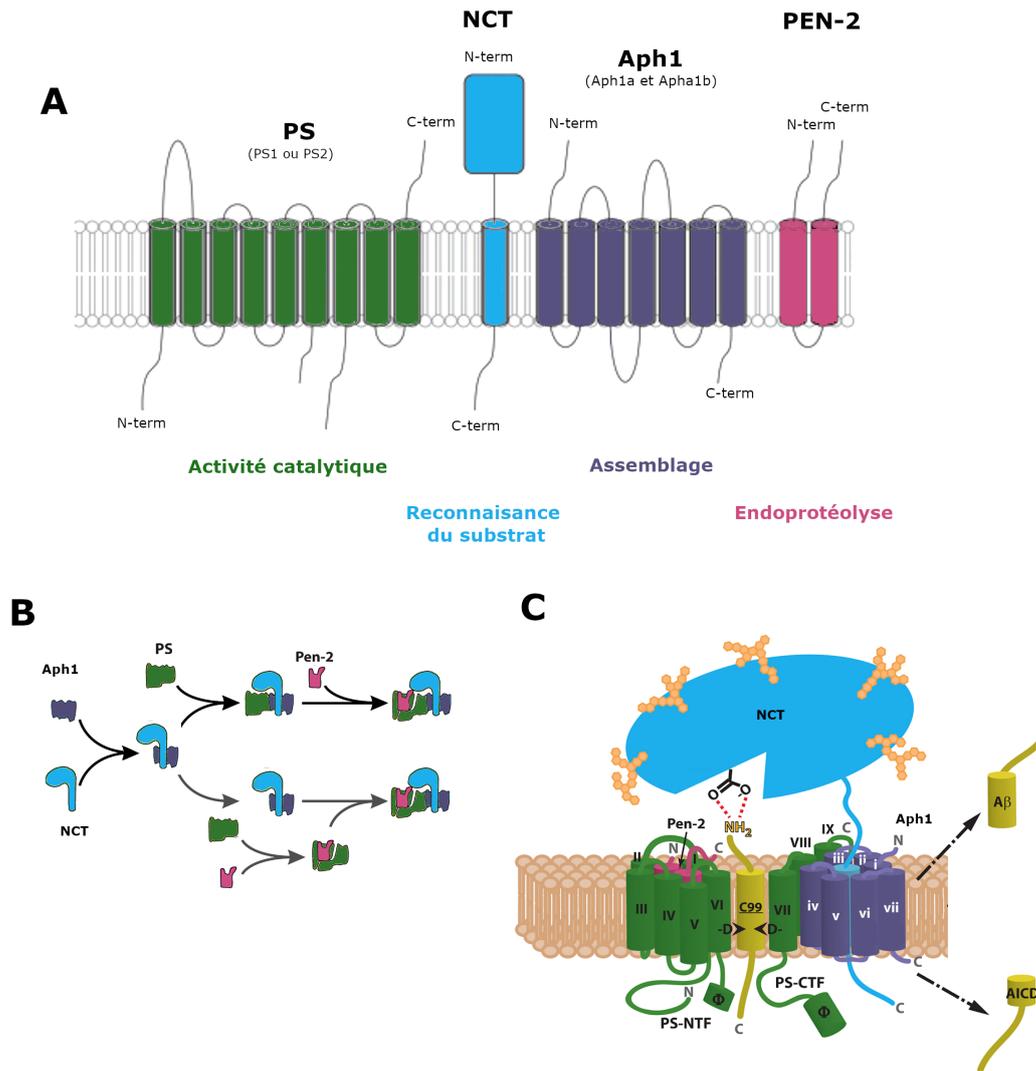


Figure 2.4.: Structure, assemblage et fonctions des sous-unités de la γ -sécrétase

(A) Structure des sous-unités du complexe γ -sécrétase avec leur fonction principale respective. Les présénilines (PS) sont constituées de 9 domaines transmembranaires, Aph-1 de 7 domaines transmembranaires, Pen-2 de 2 domaines transmembranaires et ses deux extrémités sont du côté extramembranaire/extravésiculaire et la nicastrine (NCT) d'1 seul domaine transmembranaire et un large domaine extramembranaire/extravésiculaire. (B) Assemblage du complexe : deux modèles sont proposés. La première étape semble être une association entre la NCT et Aph-1 qui a lieu dans le RE et se fait *via* plusieurs domaines transmembranaires d'Aph-1. La PS vient ensuite s'ajouter au pré-complexe, soit seule, soit en association avec Pen-2. L'interaction des PS avec la nicastrine se fait *via* son domaine C-terminal et avec Pen-2 *via* son 4^{ème} domaine transmembranaire. Enfin, l'interaction entre Aph-1 avec la PS se fait *via* le motif GxxxG présent sur son 4^{ème} domaine. (C) Pour être biologiquement active, les PS doivent subir un clivage entre le 6^{ème} et le 7^{ème} domaine transmembranaire (région hydrophobique), permettant l'hétérodimérisation des fragments N- et C-terminaux nouvellement produits. Pen-2 participe à cette protéolyse. Les résidus acides aspartiques catalytiques se trouvent dans les domaines VI et VII. La nicastrine est fortement glycosylée dans le complexe actif et interagit avec le substrat. (Sources : DRIES et YU, 2008 ; SPASIC et ANNAERT, 2008)

γ -sécrétase. En effet, d'après le modèle proposé par le Dr Ihara, le C99 subirait un clivage initiateur par une endopeptidase — appelé clivage ϵ —, libérant un fragment soluble, l'AICD et une forme longue d'A β et l'AICD, suivi de clivages multiples par des carboxypeptidases) — clivage ζ puis clivage γ — qui retirent 3 ou 4 acides aminés à l'A β intermédiaire ce qui correspond environ à un tour d'hélice intra-membranaire. Ces clivages dépendent de la composition du complexe et génèrent au cours des clivages des peptides de taille différente : A β_{48} ou A β_{49} (site ϵ), A β_{45} ou A β_{46} (site ζ) et A β_{43} puis A β_{40} ou A β_{42} (site γ). Un dernier clivage peut avoir lieu pour produire des espèces encore plus courtes : l'A β_{37} et l'A β_{38} , ce dernier étant avec l'A β_{42} , les formes prédominantes après l'A β_{40} (TAKAMI et al., 2009 ; DE STROOPER et al., 2012 ; WOLFE, 2019) (voir [Figure 2.5](#)).

L'activité γ -sécrétase semble être influencée par l'épaisseur et la composition de la membrane (O. HOLMES et al., 2012 ; WINKLER et al., 2015). D'autre part, la composition même du complexe va dépendre de la localisation subcellulaire et conditionner la nature du peptide A β . En effet, il a été montré récemment que les complexes contenant la PS2 présentent une distribution distincte de ceux contenant la PS1 (SANNERUD et al., 2016 ; MECKLER et CHECLER, 2016). Plus précisément, les complexes formés avec la PS2 seraient majoritairement localisés dans les endosomes tardifs et les lysosomes et donc à l'origine de la formation d'A β dans la voie endosomale alors que les complexes formés avec la PS1 sont répartis de façon plus homogène dans la cellule, présents notamment à la membrane plasmique où ils permettent la libération de l'A β en extracellulaire (MECKLER et CHECLER, 2016 ; CASTRO et al., 2019 ; SANNERUD et al., 2016). Autrement dit, **la production intracellulaire d'A β serait liée aux complexes contenant la PS2 et l'A β sécrété en extracellulaire à ceux contenant PS1**. D'autre part l'étude du Dr Sannerud montre également que le clivage γ -sécrétase en intracellulaire conduit à la formation de formes plus longues d'A β (A β_{43} et A β_{42}), due probablement à une activité carboxypeptidase réduite dans les compartiments acides.

Je me suis focalisée sur le rôle de la γ -sécrétase dans la coupure de l'APP. Néanmoins, il est important de préciser qu'à ce jour, plus de 90 substrats ont été identifiés et majoritairement des protéines transmembranaires de type I. Parmi eux, je décrirai uniquement le récepteur Notch, qui est le premier substrat découvert et le plus étudié, ainsi que la protéine SORLA, une des protéines que j'ai étudiée pendant ma thèse.

- **Notch** : la découverte du clivage Notch par la γ -sécrétase a permis de mettre en avant pour la première fois, le rôle de ce complexe dans la transactivation de gènes cibles (SCHROETER et al., 1998). En effet, la coupure γ -sécrétase de Notch libère, comme c'est le cas pour l'APP, un fragment cytosolique appelé NCID — pour "Notch Intracellular Domain" —, capable de se lier au facteur de transcription CSL pour activer des gènes cibles impliqués dans le développement embryonnaire. Il est ainsi intéressant de noter que l'invalidation de PS1 est létale au stade embryonnaire mais celle de PS2 reste viable (DONOVIEL et al., 1999; HERREMAN et al., 1999).
- **SORLA** : l'identification de SORLA comme substrat de la γ -sécrétase est plus récente et pour le moment, il existe peu d'indices sur le rôle de cette coupure dans la fonction de SORLA. Cette protéine joue un rôle important dans le transport intracellulaire de l'APP comme je le décrirai plus tard (voir [2.3.2 Importance de la protéine SORLA](#)).

Dans la MA Comme décrit précédemment (voir [IV Discussion et perspectives](#)), des mutations sur les présénilines 1 ou 2 sont responsables des FAD. Ces mutations semblent entraîner une altération de l'activité de la γ -sécrétase, conduisant à la libération de formes plus longues d'A β (A β_{43} et A β_{42}) et donc une augmentation du ratio A β_{42} /A β_{40} . Plusieurs études suggèrent que cet effet serait lié à une diminution de l'activité carboxypeptidase. D'une part, l'équipe du Dr Sannerud a montré que certaines des mutations sur *PSEN 1* associées aux FAD, entraînent une relocalisation de la PS1 dans les endosomes/lysosomes. En d'autres mots, **les mutants *PSEN1* mimerait la forme PS2 et augmenterait la production de formes plus longues d'A β et plus agrégantes en intracellulaire**. Les mutations sur *PSEN2* associées aux FAD exacerberaient également la formation des formes plus longues d'A β , mais sans affecter la localisation de PS2 (SANNERUD et al., 2016) (voir [Figure 2.6](#)). D'autre part, le Dr Szaruga a proposé que les mutations sur *PSEN1* provoqueraient une déstabilisation du complexe enzyme/substrat, à savoir la γ -sécrétase et les formes intermédiaires d'A β , conduisant à la libération d'A β de taille plus longue (SZARUGA et al., 2017).

Plusieurs approches thérapeutiques ont cherché à inhiber l'activité γ -sécrétase chez les patients Alzheimer. À ce jour, les essais cliniques utilisant cette stratégie n'ont pas montré leur efficacité chez l'Homme, révélant au contraire une augmentation du déclin cognitif chez certains patients. De façon comparable aux inhibiteurs β -sécrétase, les effets néfastes induits par cette inhibition peuvent s'expliquer en

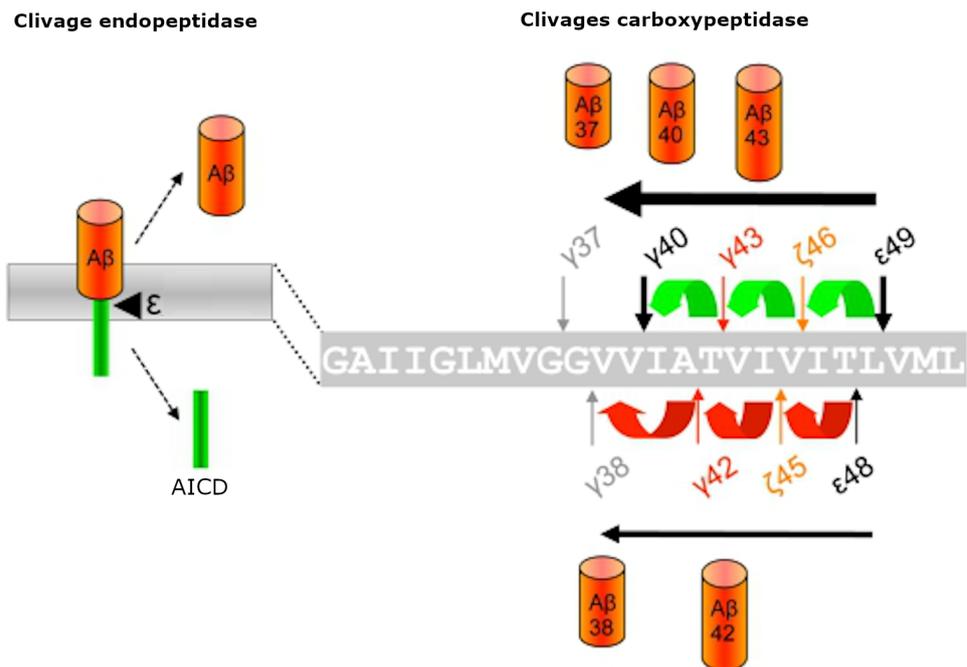


Figure 2.5.: Clivage séquentiel du C99 par la γ -sécrétase

Le clivage successif du C99 par l'activité endopeptidase puis carboxypeptidase de la γ -sécrétase conduit à la production de différentes espèces d'A β , de taille plus ou moins longues. Les plus longues seraient les plus toxiques dans la MA. (Source : STEINER et al., 2018)

partie par la grande quantité de substrats de la γ -sécrétase. Cette stratégie sera discutée dans la partie [IV Discussion et perspectives](#), se basant sur les résultats obtenus pendant mes travaux de thèse.

2.2.3 Rôles physiopathologiques des fragments – Focus sur les métabolites du C99

Qu'ils soient issus de la voie amyloïdogénique ou non-amyloïdogénique, les différents fragments de l'APP semblent avoir une fonction physiologique. Cependant, les niveaux de ces fragments sont modifiés chez les patients Alzheimer, notamment à cause de la dérégulation des sécrétases. Mon travail de thèse se concentrant sur le C99, j'ai décidé de ne détailler que le rôle de ses métabolites : l' $A\beta$ et l'AICD. Le sAPP β produit en même temps que le C99 aurait un rôle pro-apoptotique alors que son pendant dans la voie non-amyloïdogène, le sAPP α a été montré comme étant neuroprotecteur.

$A\beta$ Comme largement présenté auparavant, le peptide $A\beta$ est un acteur majeur dans la maladie d'Alzheimer. En réalité, ce peptide peut avoir deux effets antinomiques, neurotoxique ou neurotrophique, en fonction de sa concentration, dépendante elle-même de l'environnement cellulaire et de l'âge de l'individu. À des taux faibles, l' $A\beta$ présente un rôle bénéfique avec des fonctions physiologiques définies (voir remarque [6 : Fonctions diverses du peptide \$A\beta\$](#)) alors qu'à des taux plus élevés, comme c'est le cas chez les personnes âgées ou dans la MA, il deviendrait toxique. **La toxicité de l'APP est liée à la forme sous laquelle il est retrouvé, qui se définit par différents paramètres :**

Sa taille Dans la voie amyloïdogène, le clivage par la γ -sécrétase peut générer des fragments allant de 37 à 49 acides aminés : $A\beta_{37}$ à $A\beta_{49}$, les plus connus dans la MA étant l' $A\beta_{40}$ et l' $A\beta_{42}$. L' $A\beta_{42}$ est la forme la plus toxique, en raison de sa grande capacité d'agrégation, induite notamment par la présence de 2 acides aminés très hydrophobes en C-terminal. Diverses troncations en N- et C-terminales sont également à l'origine de formes plus ou moins courtes d' $A\beta$ et décrites comme étant toxiques dans la MA, comme le pyroglutamate.

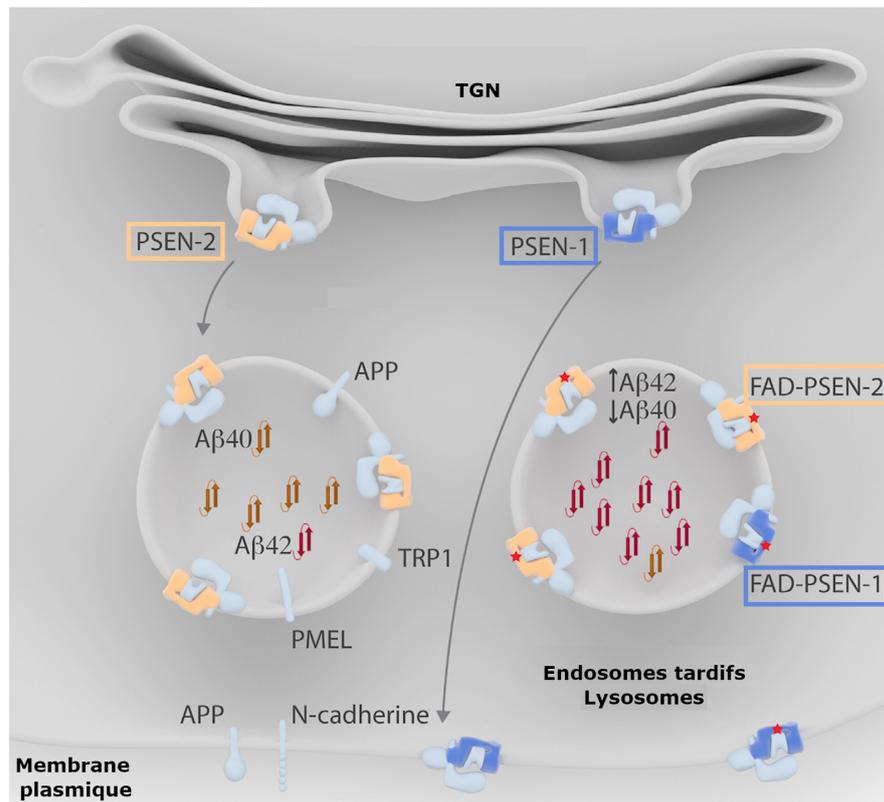


Figure 2.6.: Changement de localisation subcellulaire de PS1 dans les FAD

En condition normale, la PS1 (ou PSEN-1) est majoritairement localisée à la membrane plasmique. Dans le cas des mutations FAD, PS1 est relocalisée dans les compartiments endolysosomiaux où se situe préférentiellement la PS2 (ou PSEN-2), ce qui conduit à la production de formes plus longues d'Aβ comme l'Aβ₄₂ qui va s'accumuler en intracellulaire. (Source : SANNERUD et al., 2016)

Sa conformation L'A β peut être présent dans le cerveau sous forme de monomères, d'oligomères solubles ou d'oligomères agrégés insolubles, ces derniers formant les fibrilles.

Lorsqu'ils sont sous forme monomérique et à faible concentration, les deux peptides majoritaires A β_{40} et A β_{42} ont un rôle physiologique notamment dans la neurogenèse, la survie neuronale et la plasticité synaptique. Les formes associées à la MA sont les fibrilles et les oligomères solubles. Pendant longtemps, les plaques amyloïdes ont été considérées comme la cause principale de la maladie et induisant les autres phénotypes toxiques (voir [2.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde](#)). Cependant, le manque de corrélation entre ces plaques séniles et les déficits cognitifs laisse penser que ces formes seraient en réalité une conséquence tardive de la pathologie. Au contraire, les formes oligomériques solubles, qui apparaissent avant les fibrilles, semblent mieux corrélées avec les symptômes de la maladie. Leur toxicité serait liée à l'interaction de ces oligomères avec un certain nombre de récepteurs de la cellule, entraînant une altération des processus physiologiques comme un dysfonctionnement mitochondrial, un stress oxydatif, une dérégulation de l'homéostasie calcique, une réponse inflammatoire, un dysfonctionnement synaptique et de la mémoire. Ces interactions sont possibles grâce à la libération, sous cette forme soluble, d'acides aminés hydrophobes permettant des interactions hydrophobes et électrostatiques. Dans le cas des fibrilles, ces acides aminés sont séquestrés à l'intérieur des plaques, ce qui empêche ce type d'interaction. En ce sens, les plaques amyloïdes peuvent apparaître comme protectrices car réduisant les quantités d'oligomères solubles d'A β (REISS et al., 2018).

Sa localisation L'A β s'accumule en extracellulaire formant les plaques amyloïdes mais il peut également s'agréger en intracellulaire, notamment dans les endosomes et les lysosomes (LAFERLA et al., 2007 ; BAYER et WIRTHS, 2010) ou les mitochondries (DEL PRETE et al., 2017). Il a été démontré que cette accumulation intraneuronale précède l'accumulation extracellulaire et qu'elle corrèle davantage avec les déficits synaptiques et cognitifs (ODDO et al., p. d. ; GOURAS et al., 2000 ; LAFERLA et al., 2007). Enfin, l'accumulation d'A β dans les compartiments endosomaux et lysosomaux provoque une perturbation de l'activité de ces organites et donc des défauts de dégradation. Ce point sera détaillé dans le chapitre [4 Défauts de clairance dans la maladie d'Alzheimer](#).

Remarque 6 : Fonctions diverses du peptide $A\beta$

À faible concentration, il serait impliqué dans plusieurs fonctions physiologiques :

- **la neurogenèse** : $A\beta$ aurait des propriétés neurotrophiques chez l'embryon et à l'âge adulte (différenciation des cellules souches neurales et prolifération des neurites)
- **la survie neuronale** : $A\beta$ protégerait notamment contre l'excitotoxicité.
- **la défense contre le stress oxydatif** : $A\beta$ serait capable de recapturer certains métaux (Cu, Fe, Zn), jouant ainsi le rôle d'anti-oxydant.
- **la régulation du métabolisme et du transport du cholestérol.**
- **l'activité anti-microbienne** : $A\beta$ aurait des propriétés anti-bactériennes, anti-fongiques et anti-virales. Cette propriété viendrait de sa capacité à former des fibrilles, qui vont s'intégrer à la membrane des microbes, formant ainsi des pores et entraînant leur mort. Les agrégats d' $A\beta$ pourraient également immobiliser les microbes et favoriser leur destruction).
- **la suppression tumorale** : $A\beta$ permettrait d'intercepter des virus oncogènes et d'inhiber la croissance tumorale, en retardant la néovascularisation ou en neutralisant certains nutriments (ions free metal). De ce fait, le risque de développer différents types de cancers est diminué chez les patients Alzheimer.
- **le maintien de l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique** : $A\beta$ se lierait aux solutés apportés par le sang peut former un « bouchon », aux endroits où la barrière ne serait plus imperméable.
- **la récupération après des dommages cérébraux** : les taux d' $A\beta$ sont fortement augmentés après un choc cérébral.
- **la régulation de l'activité synaptique** : $A\beta$ régulerait la réponse des synapses cholinergiques et glutamatergiques dans l'hippocampe. En conséquence, il participerait à la LTP, l'apprentissage et la mémorisation.

La diversité de ses fonctions physiologiques provient probablement de l'hétérogénéité même des peptides $A\beta$.

(BROTHERS et al., 2018)

AICD L'AICD est formé au cours des 2 voies canoniques de l'APP, après le clivage ϵ du C83 ou du C99 par la γ -sécrétase. Néanmoins, il semblerait que la forme transcriptionnellement active s'effectue principalement *via* la voie amyloïdogène, autrement dit le C99 serait le précurseur exclusif de la forme transcriptionnelle d'AICD (FLAMMANG et al., 2012; GOODGER et al., 2009). Tout comme l' $A\beta$, plusieurs formes d'AICD ont été identifiées (de 48 à 53 acides aminés), la forme prédominante étant l'AICD₅₀. L'AICD est un fragment très instable et très susceptible à la protéolyse, ce qui complique l'étude de ses fonctions physiopathologiques. Les premiers travaux se sont d'abord concentrés sur son implication dans la mort cellulaire par apoptose (PASSER et al., 2000). Ensuite, par analogie avec le fragment NCID produit lors du clivage de Notch par la γ -sécrétase, de nombreuses études se sont intéressées à son rôle en tant que facteur de transcription. En effet, il a été montré que l'AICD est capable de transloquer dans le noyau, notamment grâce à son interaction avec Fe65, et ainsi d'activer la transcription d'une trentaine de gènes *via* son interaction avec l'acétyltransférase Tip60. Les gènes régulés par l'AICD sont impliqués dans la mort cellulaire comme p53 (ALVES DA COSTA et al., 2006), dans

le métabolisme ou la dégradation d'A β comme BACE, SORLA, la népyrylisine (NEP) (PARDOSSI-PIQUARD et al., 2005 ; PARDOSSI-PIQUARD et CHECLER, 2012), dans la phosphorylation de Tau comme la GSK3 β ou dans la mitophagie comme PINK-1 (GOIRAN et al., 2018). L'AICD s'autorégule en activant également l'expression de son propre précurseur, l'APP (von ROTZ et al., 2004). Enfin les niveaux d'AICD sont augmentés dans le cerveau des patients Alzheimer, participant ainsi probablement au développement de la MA (GHOSAL et al., 2009 ; CACCAMO et al., 2005). (pour revue voir BUKHARI et al., 2017)

La complexité de la maladie d'Alzheimer vient en grande partie de la complexité du métabolisme de l'APP : les différentes voies de clivage, la diversité des fragments générés et des formes d'A β . La meilleure compréhension de ces différents acteurs permet de mettre en lumière de nouvelles cibles pour le diagnostic et la thérapie. Dans ma thèse, je me suis particulièrement intéressée au fragment C99.

2.3 Le trafic intracellulaire

Comme l'ensemble des protéines transmembranaires de type I, l'APP est trafiquée dans la cellule *via* la voie de sécrétion constitutive, la voie endo-lysosomale et la voie de recyclage. De ce fait, l'APP est localisée dans différents compartiments subcellulaires : le réticulum endoplasmique (RE), le réseau trans-golgien (TGN) — pour "Trans-Golgi Network" — où son expression est la plus importante, la membrane plasmique, les endosomes et les lysosomes (THINAKARAN et KOO, 2008). L'APP a aussi été détectée dans la mitochondrie, le cytosol ou le noyau. Au niveau neuronal, elle est retrouvée dans le compartiment soma-dendritique mais aussi au niveau de l'axone.

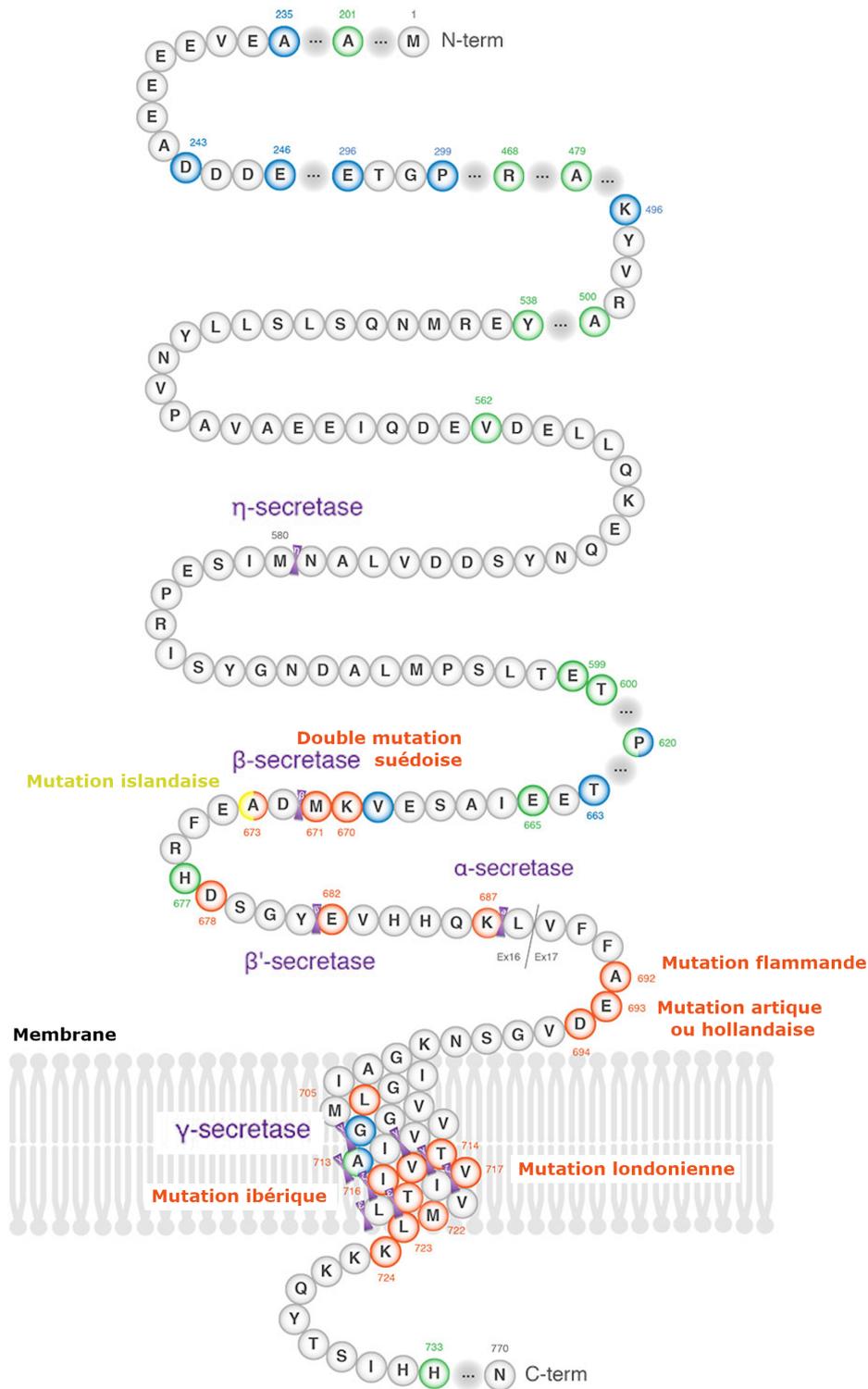


Figure 2.7.: Mutations de l'APP impliquées ou non dans le développement des FAD

Séquence humaine de l'APP avec la localisation des mutations identifiées jusqu'à présent. La majorité des mutations causant la MA (en rouge) sont localisées au niveau du site de clivage des différentes sécrétases (indiquées en violet) ou au niveau de la région juxtamembranaire. Sont indiquées en vert les mutations non-pathogènes dans le cas de la MA et en bleu celles dont l'effet est plus incertain. Une seule mutation a été montrée comme étant protectrice contre la MA (en jaune), la mutation islandaise, qui se situe près du site β . (Source : (Alzforum))

2.3.1 Convergence subcellulaire de l'APP et de ses sécrétases

Le transport de l'APP dans la cellule est possible grâce à la présence, dans sa séquence, de trois motifs de triage, qui permettent son adressage vers les différents compartiments (voir [Figure 2.1](#) et [remarque 7 : motifs de triage de l'APP](#)). En condition physiologique, ce transport est finement régulé par différentes phosphorylations de ces motifs, situées sur sa partie C-terminale et effectuées par plusieurs kinases connues (PKC, CAMKII, GSK3 β ou CDK5).

Après synthèse, l'APP est transloquée dans le **RE**, où il perd alors son peptide signal en N-terminal. Elle est ensuite transportée vers l'**appareil de Golgi et le TGN** où elle subit un grand nombre de modifications post-traductionnelles (N- et O-glycosylations, phosphorylations et sulfatations), nécessaires à l'obtention de sa forme mature et de sa structure tridimensionnelle. À partir du TGN, l'APP est exportée dans des vésicules sécrétoires (côté N-terminal à l'intérieur des vésicules et côté C-terminal vers le cytoplasme) en direction de la **membrane plasmique**. Cette succession d'évènements constitue la voie de sécrétion. À la membrane plasmique (côté N-terminal extracellulaire et côté C-terminal vers le cytoplasme), l'APP sera clivée majoritairement par l' α -sécrétase. Seulement 10 % environ de l'APP réside à la membrane plasmique alors que la majorité est transportée dans les compartiments intracellulaires. En effet, l'APP non clivée à la membrane est rapidement internalisée dans les **endosomes précoces**. Cette endocytose a lieu *via* des vésicules à manteau de clathrine et grâce à son motif YENPTY. À partir des endosomes, l'APP peut rejoindre trois voies différentes : (1) la majorité est adressée vers la voie endosomale pour sa dégradation dans les lysosomes (voie lysosomale) ou son incorporation dans les exosomes (voie exosomale) (voir [4.2 Les voies de dégradation endosomale-lysosomale-autophagique \(EAL\)](#) et [7.1 La biogenèse des exosomes](#)) alors que la partie restante est (2) recyclée à la membrane ou (3) dirigée vers l'appareil de Golgi *via* un transport dit rétrograde. À la membrane des endosomes (côté N-terminal à l'intérieur des vésicules et côté C-terminal vers le cytoplasme), une partie de l'APP est clivée par la β - puis γ -sécrétase générant le C99 et l'A β , qui rejoindront majoritairement la voie lysosomale en condition normale. Enfin, l'APP présente dans le TGN peut également rejoindre directement les endosomes, sans passer par la membrane plasmique, *via* un transport dit antérograde. L'orientation de l'APP dans les différentes vésicules renseigne sur la localisation de l'A β produit (voir [Figure 2.8](#)).

Rôle du cholestérol Le métabolisme de l'APP est également influencé par le transport de l'APP vers des microdomaines lipidiques appelés radeaux lipidiques, qui dépend de son interaction avec le cholestérol. Ces radeaux lipidiques augmentent l'activité β -sécrétase alors qu'ils diminuent l'activité α -sécrétase.

Un lien entre la MA et les lipides, et en particulier le cholestérol, a été proposé dès les premières descriptions de la maladie par Alois Alzheimer. En effet, il avait observé dans le cerveau de sa patiente (Auguste Deter) la présence de nombreuses granules lipoïdes (ALZHEIMER et al., 1995). Depuis cette première observation, de nombreuses études ont mis en évidence des altérations lipidiques chez les patients Alzheimer, notamment une dérégulation du métabolisme du cholestérol. Plus précisément, plusieurs travaux ont montré un lien bi-directionnel entre la protéolyse de l'APP et le métabolisme des lipides (GRIMM et al., 2012). Ce lien a aussi été renforcé avec la découverte de l'APOE4, qui est le principal facteur de risque pour les sAD. L'impact de l'environnement lipidique semble cohérent au vu du clivage intramembranaire de l'APP par la γ -sécrétase. En effet, il a été montré que la coupure exacte par cette enzyme, et donc la taille de l'A β formé, dépend de l'épaisseur de la membrane et sa composition en lipides. Plus précisément, la production d'A β se produit principalement dans les radeaux lipidiques, composés de cholestérol, de gangliosides et de spingolipides et qui sont résistants aux détergents classiques. À l'inverse, dans la voie non-amyloïdogénique, la protéolyse de l'APP se produit principalement en dehors des radeaux lipidiques (GRIMM et al., 2017). Par conséquent, un régime riche en cholestérol mais également la possession de l'APOE4 dans les cas sAD augmenterait les niveaux de C99 dans les radeaux lipidiques et donc la production d'A β . De même, dans les cas FAD associés à des mutations sur *PSEN1* et dans lesquels il y a une augmentation des niveaux cellulaires de cholestérol, la proportion d'APP dans les radeaux lipidiques est augmentée (CHO et al., 2019).

Rôle des partenaires protéiques Le transport de l'APP à travers les différents compartiments subcellulaires est médié par plusieurs partenaires protéiques. Tout d'abord, l'internalisation de l'APP à la membrane plasmique se fait grâce à la protéine LRP1 — pour "LDL Receptor related Protein 1" —, par l'intermédiaire de la protéine Fe65 qui se fixe simultanément sur le motif NPxY localisé sur l'APP et sur LRP1. D'autres récepteurs de la même famille comme la mégaline (LRP2) semblerait également être impliqués dans cette internalisation. La découverte des

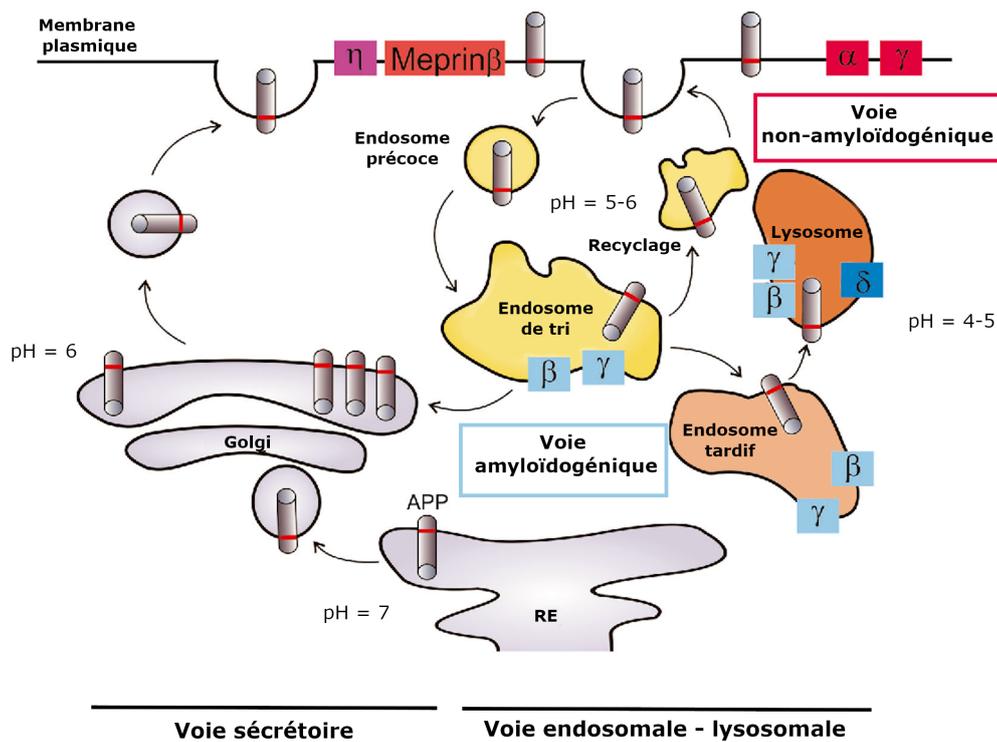


Figure 2.8.: Convergence subcellulaire de l'APP et de ses sécrétases

Schéma représentant le trafic de l'APP entre les divers compartiments subcellulaires *via* la voie sécrétoire et *via* la voie endosomale-lysosomale. En raison du pH d'action différent entre les sécrétases, la voie non-amyloïdogénique a lieu majoritairement à la membrane plasmique alors que la voie amyloïdogène se produit principalement dans les compartiments endosomaux et lysosomaux. (Source : EGGERT et al., 2018)

protéines responsables du trafic intracellulaire de l'APP est plus récente. Une des protéines clés dans ce transport est la protéine SORLA, aussi appelée LR11 ou SORL1, qui interagit avec différents complexes adaptateurs (AP1 à AP5, GGA...) et le complexe rétromère.

Remarque 7 : motifs de triage de l'APP

L'APP présente dans sa structure 3 motifs de triage contenant des tyrosines. La phosphorylation de ces différents domaines va conditionner le trafic intracellulaire de l'APP

- phosphorylation du domaine **YENPTY** (682-687) : induit l'endocytose de l'APP grâce à son interaction avec des protéines adaptatrices de la famille Mint/X11, comme Fe65.
- phosphorylation du domaine **YKFFE** (687-691) : induit le transport de l'APP du TGN directement vers les endosomes (sans passer par la membrane plasmique) grâce à l'interaction avec la protéine AP-4 – **transport antérograde** –.
- phosphorylation du domaine **YTSI** (653-636) : induit le transport de l'APP des endosomes vers le TGN (au lieu d'être dirigé vers les lysosomes) – **transport rétrograde** –.

2.3.2 Importance de la protéine SORLA

L'implication de SORLA — pour "Sortilin-related receptor with A-type repeats" — dans le transport de l'APP a été mise en évidence suite à l'identification du gène *SORL1* en tant que facteur de susceptibilité pour la MA. Ces études ont montré une baisse significative des niveaux de SORLA dans des formes sporadiques de la MA (VAN ACKER et al., 2019). D'un point de vue structural, SORLA est un récepteur qui combine des caractéristiques à la fois de la famille des récepteurs au LDL (LDLR) et de la famille des récepteurs aux domaines VSP10 (VSP10D-R) — pour "Vacuolar protein Sorting 10 Domain Receptor" —. Elle appartient également à la famille des protéines transmembranaires de type I, ce qui explique qu'elle subit des clivages similaires à ceux de l'APP. D'un point de vue subcellulaire, cette protéine est localisée majoritairement dans l'appareil de Golgi et dans les endosomes, et seulement une petite partie est retrouvée à la membrane plasmique. De plus, SORLA est fortement exprimée dans le cerveau.

D'un point de vue fonctionnel, SORLA est capable d'interagir avec l'APP et de réguler son transport entre l'appareil de Golgi et les endosomes. Plusieurs sites d'interaction sur l'APP ont été proposés comme étant impliqués dans ce transport : un au niveau de son domaine extracellulaire E2 et au moins 3 au niveau du domaine

cytoplasmique. Alors que SORLA se lie directement sur le domaine E2, la fixation sur la partie cytoplasmique (comme c'est le cas pour le C99) nécessite la liaison de SORLA à des complexes protéiques adaptateurs ou rétromère, impliquant la partie C-terminale de SORLA. En effet, le transport de l'APP de l'appareil de Golgi vers les endosomes (transport antérograde) fait intervenir les adaptateurs AP1 — pour "Activator Protein 1" —, GGA — pour "Golgi-localising, Gamma-adaptin ear homology, ARF-binding proteins" — et PACS1 — pour "Phosphofurin acidic cluster sorting protein 1" — alors que le transport des endosomes vers l'appareil de Golgi (transport rétrograde) fait intervenir le complexe rétromère (NIELSEN et al., 2007 ; WILLNOW et ANDERSEN, 2013) (voir [Figure 2.9](#)). Grâce à ces interactions, SORLA a pour rôle de séquestrer l'APP dans l'appareil de Golgi, diminuant ainsi son clivage par les sécrétases. En d'autres termes, SORLA empêche à la fois le transport de l'APP vers la membrane plasmique et donc son clivage par l' α -sécrétase, mais également son transport vers les compartiments du système endolysosomal où a principalement lieu le clivage β -sécrétase. Cette interaction de SORLA avec l'APP empêche également la formation d'homodimères d'APP, qui sembleraient être des substrats préférentiels des sécrétases. Enfin, il a aussi été montré que SORLA est également capable de se lier directement à l' $A\beta$, favorisant son adressage dans les lysosomes et donc sa dégradation. En conclusion, SORLA agit comme un récepteur de tri et joue un double rôle en réduisant le métabolisme de l'APP d'une part et en favorisant la dégradation du peptide $A\beta$ d'autre part.

Altérations de SORLA Plusieurs équipes ont montré qu'un dysfonctionnement de SORLA conduit à des modifications dans le trafic et le métabolisme de l'APP. Tout d'abord, Dumanis et collaborateurs ont mis en évidence qu'une rupture de la liaison entre SORLA et les GGA (transport antérograde) entraîne une accumulation de SORLA et de l'APP dans le TGN. Au contraire, la rupture de liaison entre SORLA et les rétromères (transport rétrograde) provoque une accumulation de SORLA et de l'APP dans les endosomes (DUMANIS et al., 2015). De façon comparable, des souris possédant des mutants APP, induisant une faible interaction avec SORLA, présentent une forte accumulation d'APP et de C99 dans les endosomes tardifs et les lysosomes (LA ROSA et al., 2015). D'autre part, la délétion de *SORL1* chez la souris entraîne également une augmentation des niveaux d' $A\beta$ dans le cerveau, *via* notamment une augmentation de la génération d' $A\beta$ dans les endosomes (ANDERSEN et al., 2005). Les souris KO présenteraient également une augmentation des dimères d'APP. Enfin,

comme décrit dans la section [1.3.3 Prédispositions génétiques](#), certains variants de SORLA ont été associés à un risque plus accru de développer la MA (sAD).

Le transport de l'APP dans les différents compartiments cellulaires est régulé par sa structure, sa conformation et ses différents partenaires de transport. La distribution subcellulaire de l'APP est importante puisqu'elle conditionne son métabolisme : l'accumulation de l'APP à la membrane plasmique favorise la voie non-amyloïdogénique alors que son accumulations dans les endosomes et lysosomes promeut la voie amyloïdogénique.

2.4 L'hypothèse de la cascade amyloïde

Peu de temps après la mise en évidence du peptide amyloïde dans les années 80, une hypothèse a été proposée par Hardy et Higgins pour expliquer l'étiologie de la maladie : l'hypothèse de la cascade amyloïde. Elle place le peptide $A\beta$ au centre de la maladie. Aujourd'hui, cette hypothèse est largement controversée et même rejetée par certains scientifiques.

2.4.1 Postulats de Hardy et Higgins – Une hypothèse controversée

Une des questions majeures sur la maladie d'Alzheimer a été et reste de connaître sa cause. Dès 1992, John Hardy et Gerald Higgins proposent l'hypothèse de la cascade amyloïde comme explication à la pathogène de la MA. Cette hypothèse stipule que **« les dépôts de peptide $A\beta$, le composant principal des plaques, est l'élément causal de la pathologie Alzheimer et les enchevêtrements neurofibrillaires, la perte cellulaire, les dommages vasculaires et la démence apparaissent dans un deuxième temps, comme le résultat direct de ces dépôts »**. Cette hypothèse s'appuie principalement sur les observations génétiques et histologiques des lésions cérébrales et de leur progression : (1) les patients atteints de trisomie 21, qui possèdent 3 chromosomes portant le gène APP, présentent très tôt des dépôts d' $A\beta$ dans leur cerveau (KOLATA, 1985), et (2) les mutations sur l'APP impliquées dans les formes familiales de la MA entraînent toutes des dépôts amyloïdes. Conscients

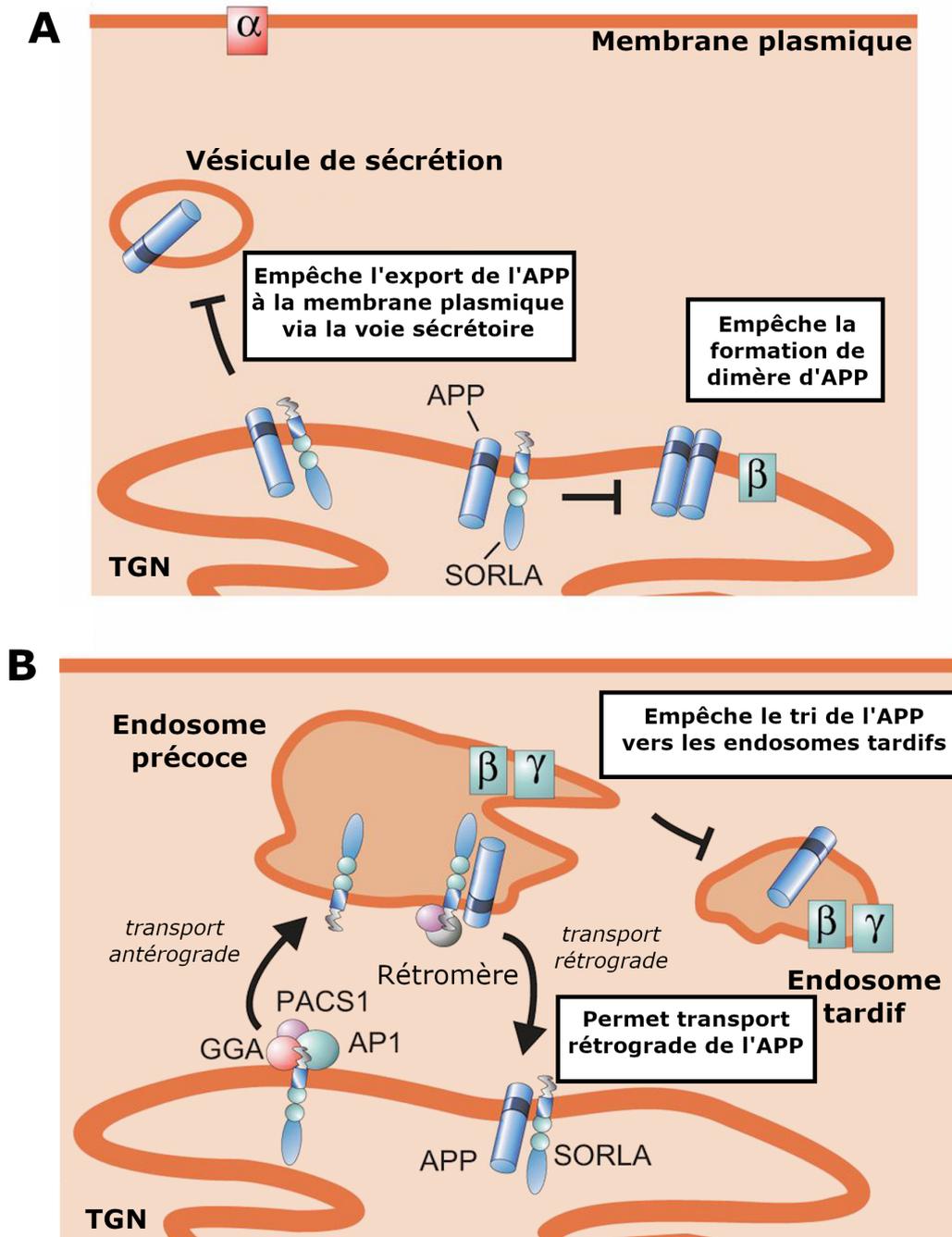


Figure 2.9.: Rôle de SORLA dans le trafic et le métabolisme de l'APP

SORLA contrôle le trafic et le métabolisme de l'APP (A) SORLA retient l'APP dans le TGN et l'empêche de rejoindre la voie sécrétoire (B) SORLA agit comme un récepteur de tri pour l'APP, permettant son transport des endosomes vers le TGN et limite ainsi la voie amyloïdogénique. (Source : WILLNOW et ANDERSEN, 2013)

que ces formes ne concernent qu'une petite partie des cas, il a été suggéré à la même époque que d'autres causes seraient impliquées dans les formes sporadiques, causes qui déclencheraient en premier lieu les dépôts amyloïdes (BEYREUTHER et MASTERS, 1991 ; J. HARDY et ALLSOP, 1991 ; SELKOE, 1991 ; J. A. HARDY et HIGGINS, 1992).

Modèles animaux de la MA Pour étudier la pathogenèse de la MA et cette hypothèse, un grand nombre de modèles de souris génétiquement modifiées a été développé, basés sur formes familiales ou l'injection intracérébrale d'A β (voir remarque 8 : [Modèles murins de la MA](#)). Bien qu'ils ne reflètent que 1% des cas, ces modèles sont très utiles pour la compréhension des mécanismes impliqués dans la maladie. Cependant, ils ne récapitulent jamais l'ensemble des caractéristiques retrouvées chez l'Homme, notamment les DNFs et la neurodégénérescence. Le modèle que nous utilisons au laboratoire est le modèle triple transgénique 3xTg-AD, développé par l'équipe du Dr La Ferla en 2003 (ODDO et al., p. d.). Ces souris expriment de façon endogène le gène *PS1* muté (PS1 M146V) et surexpriment le gène *APP* présentant la double mutation suédoise (hAPP^{swe}) et la protéine Tau mutée (hMAPT P301L). Grâce à ces différentes mutations, ce fut le premier modèle à développer à la fois les plaques séniles et la pathologie Tau. Plus précisément, ces souris ont été obtenues par micro-injection, dans une cellule unique d'embryon de souris *knock in* PS1 M146V (séquence *PS1* de souris), des deux transgènes humains APP^{swe} et MAPT P301L. Ces 2 transgènes sont sous le contrôle d'un promoteur Thy 1.2, ce qui permet de cibler l'expression dans certains types neuronaux du SNC (CARONI, 1997). De façon similaire à la pathologie humaine, ces souris développent progressivement et de façon âge dépendant une neuropathologie incluant le dysfonctionnement lysosomal-autophagique, la neuroninflammation, les déficits synaptiques et cognitifs, les plaques séniles et les enchevêtrements neurofibrillaires. De plus le phénotype est également plus prononcé chez les femelles (voir [Figure 2.10](#) et [Table 13.2](#)).

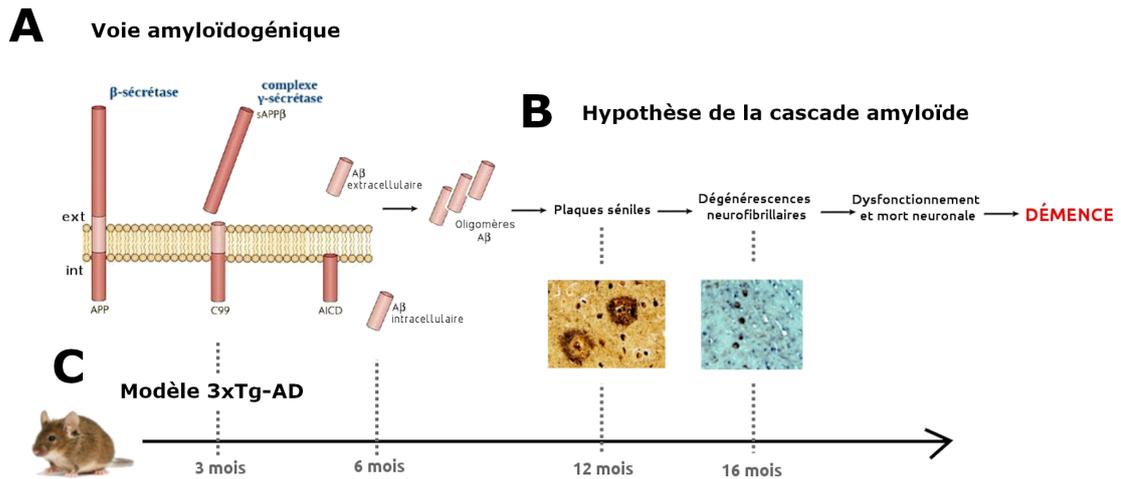


Figure 2.10.: Description du modèle 3xTg-AD : modèle en accord avec l'hypothèse de la cascade amyloïde

(A) Clivage de l'APP par la voie amyloïdogénique (B) Hypothèse de la cascade amyloïde. Depuis 20 ans, cette hypothèse constitue le principal modèle de la MA. (C) Modèle *in vivo* de la MA : les souris 3xTg-AD (hAPP^{swE}, hMAPT P301L, PSI M146V). Ces souris reproduisent la cinétique et les lésions retrouvées chez l'Homme.

Remarque 8 : Modèles murins de la MA

Ces modèles sont généralement obtenus par transgénèse.

- **Premier modèle murin** : il a été développé en 1995 par Games et son équipe, grâce à l'expression chez la souris d'une mutation familiale décrite chez l'Homme, la mutation Indiana : souris PD-APP (GAMES et al., 1995).
- **Modèles basés sur la mutation suédoise** : cette mutation est retrouvée chez l'Homme et couramment utilisée dans les modèles de la MA. Il s'agit d'une double mutation sur l'exon 16 dans lequel la lysine en position 670 est substituée par une asparagine et la méthionine en position 671 par une leucine (K670N, M671L). Cette mutation induit une augmentation de la production du fragment C99, qui est la protéine intermédiaire dans le clivage de l'APP en Aβ. Cette mutation est présente chez les modèles suivants : souris Tg2576 (HSIAO et al., 1996), souris APP23 (STURCHLER-PIERRAT et al., 1997).
- **Modèles basés sur la combinaison de plusieurs mutants et/ou mutations** : soit l'expression de plusieurs mutants de l'APP — souris TgCRN8 (CHISHTI et al., 2001), souris J20 (MUCKE et al., 2000) — soit par l'expression de plusieurs gènes mutés — souris APP/PS1 (JANKOWSKY et al., 2001), 5xFAD (OAKLEY et al., 2006).
- **Modèles knock in** : souris APP NL (mutation suédoise) (SAITO et al., 2012), souris APP NL-F (mutation suédoise + ibérique) ou souris APP NL-F-G (mutation suédoise + ibérique + arctique) (SAITO et al., 2014). Dans ces modèles, le gène APP endogène a été remplacé par le gène APP muté sans surexpression, ce qui signifie qu'il s'exprime à des niveaux physiologiques.
- **Modèles sporadiques** : il existe également quelques modèles sporadiques, ciblant le gène APOE, avec des souris knock-down pour ce gène, des souris knock-in exprimant les allèles e3 et e4 et des souris surexprimant ces mêmes allèles (HOLTZMAN et al., 2000; RABER et al., 2000). Lors de l'AD/PD 2019, le Dr La Ferla a également proposé des modèles sporadiques, basés sur l'expression knock in de l'APP humain en combinaison avec l'expression de différents gènes de prédisposition associés à la MA. Ces modèles sont en cours d'étude.
- **Modèles reproduisant la neurodégénérescence** : souris 5xFAD et souris APP/PS1.

Un grand nombre de modèles supplémentaires ont été développés aussi bien chez la souris que chez le rat. Pour revue : DRUMMOND et WISNIEWSKI, 2017; JANKOWSKY et H. ZHENG, 2017; SASAGURI et al., 2017.

Hypothèse révisée Avec l'avancée des recherches et les nouvelles données sur la maladie, l'hypothèse de la cascade amyloïde fut révisée en 2002 par Hardy et Selkoe, proposant une version plus tempérée et incluant les mutations familiales sur les présénilines, puis complétée en 2016 avec l'ajout des formes sporadiques (J. HARDY et SELKOE, 2002 ; SELKOE et J. HARDY, 2016). Cette nouvelle hypothèse propose que les oligomères d'A β_{42} , qui en s'accumulant en intracellulaire, sont directement responsables des premiers déficits synaptiques et de la réaction inflammatoire. Ces oligomères forment les plaques amyloïdes et seraient également les initiateurs de la pathologie Tau et *in fine* de la démence. La séquence détaillée des principaux évènements pathologiques conduisant à la maladie d'Alzheimer proposée par l'hypothèse de la cascade amyloïde est illustrée [Figure 2.11](#). D'après cette hypothèse, l'accumulation excessive d'A β semble avoir deux origines différentes en fonction de la forme familiale ou sporadique de la maladie d'Alzheimer. En effet, les mutations impliquées dans les cas familiaux (que ce soit sur le gène APP ou sur PS1/PS2) provoquent l'augmentation de la production d'A β_{42} ou un changement du ratio A β_{42} /A β_{40} alors que dans les cas sporadiques, c'est une réduction importante de la clairance du peptide A β qui conduit à l'augmentation de ses niveaux dans le cerveau.

Remise en cause de cette hypothèse Un grand nombre de chercheurs puis les entreprises pharmaceutiques se sont appuyées sur cette hypothèse pour développer de potentiels traitements contre la maladie d'Alzheimer. De nombreux travaux sont donc venus appuyer ou réfuter cette hypothèse centrée sur l'A β . Les différents arguments, génétiques, cliniques, basés sur des modèles cellulaires ou animaux, sont détaillés dans les remarques [9 : Arguments en faveur de l'hypothèse amyloïde](#) et [10 : Arguments contre l'hypothèse amyloïde](#). En conclusion de ces remarques, nous pouvons conclure que les preuves génétiques apportent des arguments forts en faveur de cette hypothèse alors que les essais cliniques montrent la faiblesse de ce modèle.

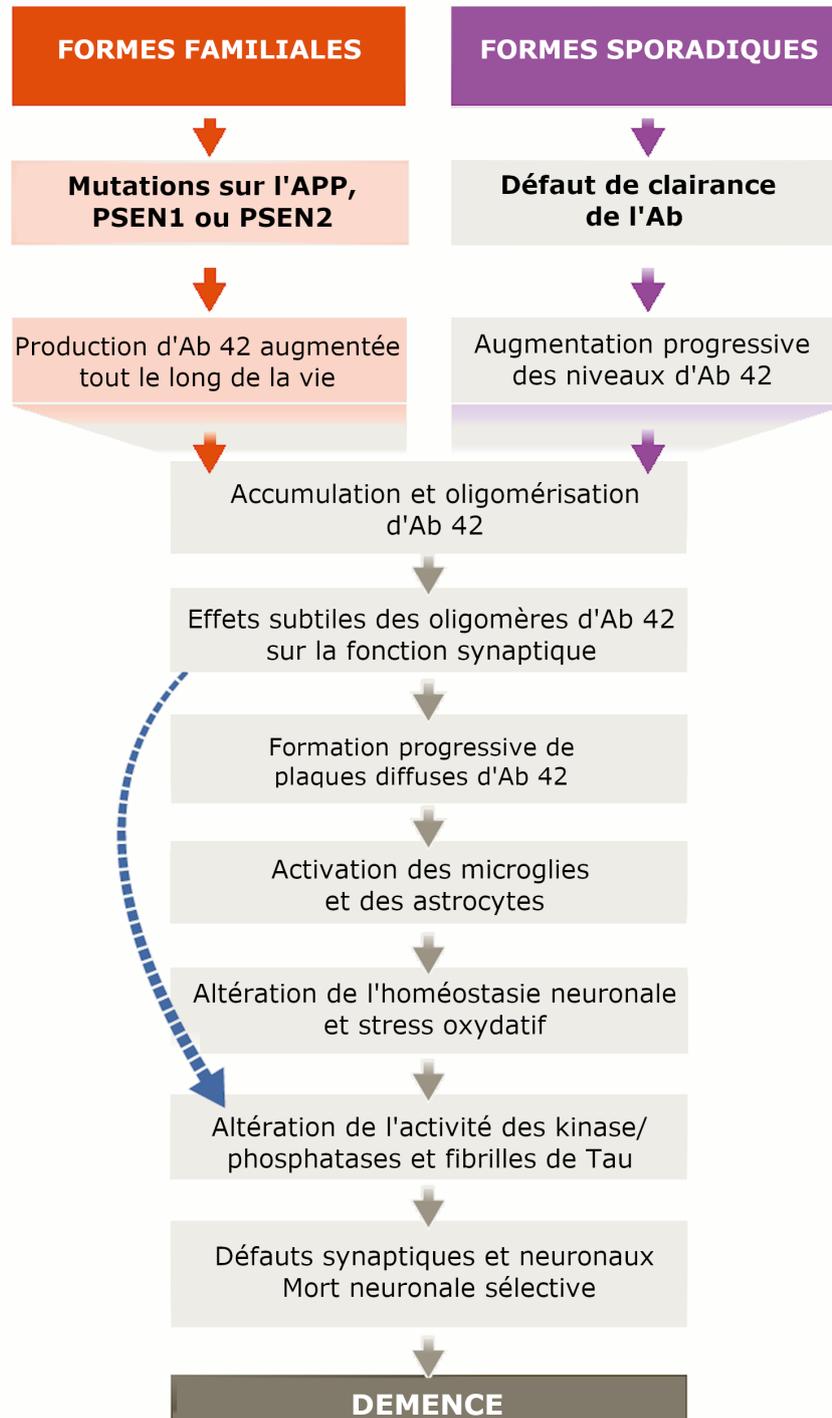


Figure 2.11.: Hypothèse de la cascade amyloïde révisée incluant les formes familiales et sporadiques de la MA

Schéma de la cascade amyloïde complétée en 2016. Cette cascade propose un rôle initiateur de l'A β_{42} , dont l'accumulation sous forme oligomérique conduit à l'ensemble des phénotypes associés à la MA et *in fine* à la démence. Dans les cas familiaux, cette accumulation serait due à une surproduction constante de l'A β_{42} alors que dans les cas sporadiques elle serait causée par un défaut de clairance. (Source : SELKOE et J. HARDY, 2016)

Remarque 9 : Arguments en faveur de l'hypothèse amyloïde

1. Preuves génétiques :

- toutes les mutations autosomiques dominantes causant la MA (FAD) ont lieu soit sur le substrat (APP), soit sur la sécrétase à l'origine de la production d'A β (PS1/PS2).
- la duplication du chromosome 21 portant le gène APP non muté (trisomie) conduit à des dépôts d'A β , qui précède la gliose et les enchevêtrements. En effet, les patients qui décèdent jeunes (par d'autres causes que la MA) présentent de nombreuses plaques diffuses d'A β mais pas de pathologie Tau ou d'astro/microgliose (KOLATA, 1985).
- la micro-duplication du gène de l'APP mais pas du reste du chromosome suffit pour induire la MA (ROVELET-LECRUX et al., 2006).
- les cas sporadiques caractérisés par la présence de l'APOE4 présentent une altération de la clairance d'A β dans le cerveau (NURIEL et al., 2017)
- une mutation sur l'APP (A673T), diminuant la production et l'agrégation d'A β , protègent contre le risque de développer la MA (JOHNSON et al., 2012).

2. Preuves provenant des modèles cellulaires ou animaux :

- la surexpression de l'APP humain chez des souris induit la formation de plaques amyloïdes.
- le traitement avec des oligomères d'A β favorise la phosphorylation de Tau (par régulation de la GSK3 β) (PARK et al., 2012).
- l'A β peut induire le clivage de Tau par les caspases, formant ainsi des fragments plus agrégants à l'origine des DNF (GAMBLIN et al., 2003).
- l'injection intracérébrale d'A β chez un modèle de souris Tau (P301L) induit l'augmentation des DNFs (GÖTZ et al., 2001).
- le croisement de souris hAPP et hTau augmente significativement les dépôts de Tau sans changement des dépôts amyloïdes (LEWIS et al., 2001).
- dans le modèle 3xTg-AD, les plaques précèdent les DNFs (ODDO et al., p. d.).
- l'injection intracérébrale de fibrilles d'A β synthétiques chez le macaque rhésus induit à l'augmentation de la phosphorylation de Tau et à la perte neuronale (GEULA et al., 1998).
- la surexpression d'hAPP chez des drosophiles entraîne de la neurodégénérescence.
- l'application/l'injection d'oligomères d'A β_{42} isolés de cerveaux de patients Alzheimer (cas sporadique) diminue la densité synaptique, inhibe le LTP et augmente la LTD de neurones hippocampiques (S. LI et al., 2018).
- plusieurs modèles transgéniques de souris surexprimant hAPP présentent des problèmes de mémoire (BOLSHAKOVA et al., 2014).

3. Preuves cliniques :

- les données chez des patients révèlent la présence d'oligomères d'A β_{42} dans le cerveau (PET scan amyloïde) et la diminution d'A β_{42} dans le LCR.
- les stratégies thérapeutiques basées sur l'immunisation active ou passive de l'A β ont permis de diminuer la charge amyloïde.

Remarque 10 : Arguments contre l'hypothèse amyloïde

1. Preuves génétiques :

- aucune mutation sur l' α ou la β -sécrétase n'a été impliquée dans les FAD.
- les mutations sur Tau n'entraîne pas l'accumulation d'A β , ni la MA.

2. Preuves provenant des modèles cellulaires ou animaux :

- une grande partie des modèles animaux basés sur l'introduction du gène APP humain dans leur génome ne développe pas les DNFs ou la neurodégénérescence.
- les souris transgéniques qui expriment uniquement le peptide A β , sans surexpression d'APP, ne développent pas de déficits cognitifs (J. KIM et al., 2013).
- les souris exprimant le gène PSEN ne développent pas de plaques, pas d'enchevêtrements, ni de neurodégénérescence.

3. Preuves cliniques :

- la présence de dépôts amyloïdes chez la majorité des personnes âgées, sans trouble de démence apparent (3/4 des personnes). De ce fait, les plaques séniles semblent être la conséquence du vieillissement normal que le déclenchement d'une cascade pathologique.
- la pathologie amyloïde et la pathologie Tau n'ont pas la même progression dans le cerveau (THAL et al., 2002; H. BRAAK et E. BRAAK, 1991; H. BRAAK et al., 2006).
- les plaques amyloïdes corrént très peu avec le degré des déficits cognitifs, contrairement aux DNFs (NAGY et al., 1996; DELACOURTE et al., 1995; GIANNAKOPOULOS et al., 2003).
- les DNFs peuvent être présentes dans le cerveau en l'absence de dépôts amyloïdes (H. BRAAK et E. BRAAK, 1997).
- certaines études suggèrent que les DNFs précèdent les plaques amyloïdes (DUYCKAERTS et al., 2009).
- cette hypothèse n'explique pas la longue période asymptomatique.
- de nombreux essais cliniques basés sur des agents anti-A β n'ont pas atteint les objectifs pré-définis.
- les stratégies thérapeutiques basées sur l'immunisation active ou passive de l'A β ne permettent pas d'améliorer les déficits cognitifs, voire les empiront (C. HOLMES et al., 2008).

2.4.2 Autres hypothèses proposées ?

Comme le montre les exemples cités précédemment, l'hypothèse de la cascade amyloïde est aujourd'hui très controversée. Une des raisons est l'échec des nombreux essais cliniques qui ont cherché à cibler l'A β , soit par immunisation active ou passive, soit en inhibant la γ -sécrétase. Bien qu'elles induisent une diminution de la charge amyloïde, ces stratégies ont montré peu ou pas d'amélioration des capacités cognitives ou même au contraire une aggravation. De plus, cette hypothèse semble trop simpliste par rapport à la complexité de cette maladie et ses multiples acteurs.

A β vs Tau ? La linéarité de cette cascade est notamment très discutée et en cause tout d'abord la différence de localisation des dépôts amyloïdes et des DNFs ainsi que le manque de corrélation entre les dépôts amyloïdes et les défauts synaptiques et cognitifs, contrairement à la pathologie Tau. La plus grande controverse autour de cette hypothèse réside donc dans le rôle d'A β ou de Tau dans l'initiation de la pathogenèse. Je ne développerai pas dans ce manuscrit l'hypothèse Tau ou les études ayant montré un lien entre APP et Tau. Cependant, les scientifiques pensent, aujourd'hui, qu'il serait plus probable que ces 2 acteurs soient indépendants, tout du moins dans les premiers stades, et qu'ils agissent en synergie pour conduire aux phénotypes toxiques de la MA (SMALL et DUFF, 2008 ; BISCHOF et al., 2016 ; PASCOAL et al., 2017).

A β et autres fragments de l'APP ? À ce jour, il n'y a aucun doute que l'A β soit un des acteurs clés de la MA mais conclure qu'il en soit la cause semble faux. Une controverse plus récente oppose donc l'implication de l'A β à celle des autres fragments de l'APP dans l'étiologie de la MA. Plusieurs arguments forts sont en faveur de cette hypothèse. Tout d'abord, la production d'A β est minoritaire par rapport à celle des APP-CTFs. De plus, une forte accumulation d'APP-CTFs, et en particulier de C99, est observée dans les cas sporadiques et familiaux de la MA (KAMETANI et HASEGAWA, 2018). D'ailleurs, mon équipe d'accueil a également montré que l'accumulation du C99, a lieu bien avant celle de l'A β dans les souris 3xTg-AD et surtout semble mieux corrélée avec les déficits synaptiques et cognitifs (LAURITZEN et al., 2016). De plus, cette étude a mis en évidence un lien étroit entre cette accumulation du C99 et le dysfonctionnement lysosomal-autophagique. Ce résultat constitue un élément clé pour mes travaux de thèse. Enfin, plusieurs études démontrent la toxicité du C99 sur d'autres phénotypes associés à la MA, comme je le décrirai dans le chapitre [3 Le C99 : nouvel acteur dans la maladie d'Alzheimer ?](#). L'ensemble de ces données suggèrent donc un rôle important des APP-CTFs et non de l'A β dans l'initiation de la maladie.

Autres mécanisme ? Enfin, d'autres hypothèses se tournent également vers des mécanismes plus précoces, liés à des dysfonctionnements cellulaires pouvant être à l'origine des autres marqueurs de la pathologies. Parmi les mécanismes proposés, le défaut du système endolysosomal évoqué précédemment, une perte de fonction des mitochondries ou la neuroinflammation sont les hypothèses plus étudiées.

L'hypothèse de la cascade amyloïde apparaît aujourd'hui comme le modèle dominant et le plus abouti pour expliquer la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Le métabolisme de l'APP semble être au cœur de la MA, quelque soit la forme familiale ou sporadique. De plus, cette hypothèse a été et reste la base pour le développement d'un grand nombre de traitements, testés en essais cliniques. Cependant, l'échec de la totalité des essais cliniques pousse à revoir les tenants de cette hypothèse, ce qui conduit à l'émergence de nouveaux acteurs et de nouveaux mécanismes pouvant expliquer l'origine de la MA, comme le C99 et le dysfonctionnement lysosomal-autophagique.

Le C99 : nouvel acteur dans la maladie d'Alzheimer ?

La maladie d'Alzheimer est généralement associée à la toxicité du peptide $A\beta$, produit au cours de la voie amyloïdogénique. Néanmoins, des études plus récentes s'intéressent également à l'implication des autres fragments générés par cette voie, et notamment le fragment C99. L'étude du C99 dans le contexte de la MA est d'autant plus pertinente qu'il est connu que les niveaux de BACE 1, enzyme portant l'activité β -sécrétase, sont augmentés chez les patients Alzheimer. Cette hypothèse est aussi renforcée par des évidences génétiques démontrant que certaines mutations associées aux FAD favorisent le clivage par BACE 1 et donc la production du C99 alors que la mutation islandaise qui diminue le clivage par BACE 1 est protectrice contre la MA.

3.1 L'accumulation du C99 dans la maladie d'Alzheimer

3.1.1 Études chez la souris

Modèle 3xTg-AD Comme largement évoqué précédemment, la majorité du peptide amyloïde est capable de s'accumuler en extracellulaire et former les plaques séniles. De façon intéressante, les anticorps habituellement utilisés pour détecter l' $A\beta$ ont également mis en évidence la présence d'un marquage intracellulaire chez plusieurs modèles de souris Alzheimer, dont le modèle 3xTg-AD. La description de ce marquage a conduit au fil des années à des résultats contradictoires quant à sa

nature biochimique. De façon logique, il fut dans un premier temps associé à l'A β par le groupe du Dr La Ferla, qui suggèra l'implication de l'A β intracellulaire dans les phénotypes précoces de la MA. En effet, chez les souris 3xTg-AD, ce marquage est précoce mais augmente avec l'âge, et semble parfaitement corrélé avec les défauts synaptiques, contrairement aux plaques séniles ou aux DNFs (ODDO et al., p. d. ; BILLINGS et al., 2005). Dans un second temps, l'équipe du Dr Lee décrit ce marquage comme une accumulation intraneuronale de l'APP entière (APPfl) — pour "full length" — (Winton et al. 2011, publication rétractée). Enfin, mon équipe d'accueil a mis en évidence en 2012 que **ce marquage intracellulaire correspondait en réalité à du C99, proposant alors un rôle du C99 dans la pathogenèse de la MA**. En effet, les anticorps utilisés en routine pour reconnaître l'A β sont dirigés contre la partie N-terminale de l'A β (anticorps 6E10, 2H3, WO2 et 4G8) et permettent donc également la détection du C99 ou de l'APPfl. Au contraire, d'autres anticorps comme le Fca18 et le 82E1, reconnaissent l'Asp 1 et sont donc spécifiques de l'A β et du C99, mais pas de l'APPfl (voir remarque 11 : [Anticorps utilisés pour reconnaître les différents métabolites d'APP](#)). Ainsi, grâce à une étude plus approfondie et basée sur diverses approches à la fois immunohistochimiques, génétiques et pharmacologiques, il a été établi au laboratoire que ce marquage était du C99, et non de l'A β ou de l'APPfl. Plus précisément, ils ont observé que l'accumulation intraneuronale de C99, chez les souris 3xTg-AD, était très précoce (dès 3 mois) et observable bien avant que l'A β ne soit détectable par des méthodes même très sensibles comme le test ELISA. Cette accumulation intracellulaire débute dans des régions bien particulières du cerveau, le subiculum puis la corne d'Amon CA1 de l'hippocampe. D'un point de vue sub-cellulaire, le C99 s'accumule majoritairement dans les compartiments de la voie endolysosomale et autophagique (EAL) — pour "Endosomal-Autophagic-Lysosomal" — (LAURITZEN et al., 2012 ; LAURITZEN et al., 2016).

Une des questions suivantes a été de comprendre l'origine de cette accumulation de C99. Une des hypothèses évidentes était une perte de fonction de la γ -sécrétase liée à la mutation sur le gène *PSEN1* présente dans ce modèle (M146V), d'autant plus qu'en condition normale la γ -sécrétase est principalement active dans les compartiments EAL. Pour valider ou exclure cette hypothèse, mon équipe d'accueil a généré le modèle 2xTg-AD (hAPP^{swe} et hMAPT P301L) et a montré une accumulation de C99 identique dans les deux modèles, alors que l'accumulation d'A β était plus forte dans le modèle 3xTgAD, comme attendu avec la mutation PS1 M146V. Ces résultats ont permis d'exclure la possibilité que cette accumulation de C99 soit liée à une

perte de fonction de la γ -sécrétase. Mon équipe avait montré par ailleurs que cette accumulation n'est pas causée par une augmentation de l'activité de BACE1.

La deuxième hypothèse pouvant expliquer l'accumulation de C99 dans ces compartiments chez les souris 3xTg-AD serait un défaut de dégradation par la voie lysosomale-autophagique. Plusieurs indices étaient en faveur de cette hypothèse. Notamment, le fait que l'utilisation *in vitro* d'inhibiteurs de la voie lysosomale entraîne une accumulation du C99 alors que des activateurs autophagiques réduisent cette accumulation (LAURITZEN et al., 2016), en accord avec de nombreuses études montrant la dégradation du fragment C99 par la voie lysosomale-autophagique (voir 4.2 Les voies de dégradation endosomale-lysosomale-autophagique (EAL)). Un rôle particulier des cathepsines B et D dans cette dégradation a été identifié. De manière intéressante, ces travaux ont également pu démontrer que l'accumulation de C99 pouvait elle aussi impacter la fonction endolysosomale-autophagique (voir 4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer). Ainsi, ces études ont mis en évidence **une boucle pathologique dans laquelle l'accumulation de C99 serait à la fois la conséquence et la cause d'un dysfonctionnement de cette voie de dégradation.**

Remarque 11 : Anticorps utilisés pour reconnaître les différents métabolites d'APP

Il existe de nombreux anticorps permettant de reconnaître les différentes espèces issues du clivage de l'APP, mais je ne détaillerai dans cette remarque que ceux utilisés pendant mes travaux de thèse. La combinaison de ces différents anticorps permet d'identifier plus spécifiquement les espèces observées, notamment en immunohistochimie.

- Anticorps C-terminal de l'APP : anti-APPct – espèces reconnues : APPfl, C99, C83, AICD mais pas $A\beta$.
- Anticorps N-terminal de l'APP : 22C11 – espèces reconnues : APPfl
- Anticorps N-terminal de l' $A\beta$:
 - partie 1- : 6E10, WO2, 2H3 – espèces reconnues : APPfl, C99, $A\beta$ mais pas C83
 - épitope tronqué en position 1 : 82E1, Fca18 – espèces reconnues : C99 et $A\beta$
 - partie 17-24 : 4G8 – espèces reconnues : APPfl, C99, C83 et $A\beta$
- Anticorps contre les formes oligomériques : Nu1

Pour plus de détails sur les épitopes : voir LAURITZEN et al., 2016.

Le modèle 3xTgAD comporte plusieurs mutations, dont les mutations sur la PS1 et sur Tau, pouvant contribuer comme, il avait été proposé par d'autres études, au dysfonctionnement de la voie lysosomale (voir 4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer). Pour confirmer que l'expression seule du C99 étant suffisante pour causer un défaut lysosomal-autophagique, mon laboratoire a généré un nouveau modèle murin, le modèle AAV-C99.

Modèle AAV-C99 Ce modèle est basé sur l'expression virale du C99 chez des souris sauvages, sans surexpression de l'APP. Plus précisément, les souris sont injectées en intra-cérébro-ventriculaire (ICV) à la naissance, avec un vecteur viral AAV de sérotype 10 et exprimant le C99 (séquence humaine) sous le contrôle de la synapsine (**modèle AAV-C99**). L'injection de virus en ICV est une approche utilisée dans de nombreuses études pour surexprimer une protéine d'intérêt, car elle permet une bonne diffusion dans le cerveau. De façon comparable aux souris 3xTg-AD, ces souris présentent une accumulation de C99, qui s'étend néanmoins à plusieurs aires cérébrales (dont le néocortex) contrairement aux souris 3xTg-AD chez lesquelles elle est restreinte à l'hippocampe.

L'étude immunohistochimique du cerveau de ces souris a révélé des résultats importants quant à la localisation subcellulaire du C99. Comme pour les souris 3xTg-AD, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie N-terminale (82E1, Fca18) révèlent un marquage associé aux endolysosomes, qui est restreint et augmente avec l'âge. Au contraire, l'utilisation d'anticorps dirigés contre la partie C-terminale de l'APP (anti-APPct) montre un marquage localisé dans les compartiments golgiens, qui est fort et ubiquitaire. Ce modèle ne possédant pas de surexpression de l'APP, ce marquage correspond bien au fragment C99 et est de façon logique beaucoup plus faible chez les souris contrôles. De manière intéressante, le marquage associé aux endolysosomes est également reconnu par des anticorps spécifiques des protéines agrégées (Nu1 et Nu2) (M. P. LAMBERT et al., 2007). Ces résultats suggèrent donc **la présence du C99 sous deux formes bien distinctes : (1) une forme non-agrégée et associée aux compartiments Golgiens et (2) une forme localisée dans les endolysosomes, qui augmente avec l'âge et qui serait agrégée**. Ces deux types de marquages sont aussi retrouvés dans le cerveau des souris 3xTg-AD (LAURITZEN et al., 2016).

De façon logique, les souris AAV-C99 produisent également de l'A β , à partir du C99 surexprimé. Ainsi, pour s'assurer que le marquage obtenu avec les anticorps N-terminaux et localisé au niveau des endolysosomes correspond bien à du C99 et non à de l'A β , une partie des souris a été traitée avec un inhibiteur de la γ -sécrétase, appelé D6. Chez ces souris, il y a comme attendu une baisse importante des niveaux d'A β et une augmentation des niveaux du fragment C99. L'utilisation de cet inhibiteur entraîne également une très forte augmentation du marquage associé aux endolysosomes, démontrant ainsi qu'il s'agit bien d'une accumulation de C99. De façon surprenante, l'utilisation d'anticorps N-terminaux ou dirigés

contre des formes agrégées révèle aussi la présence d'un marquage extracellulaire, particulièrement fort chez les souris traitées avec le D6. Cette observation est très importante car elle constitue un des points de départ du deuxième axe de mon projet de thèse, présenté dans le chapitre 9 [Axe 2 : Enrichissement des formes oligomériques d'APP-CTFs dans les exosomes issus de modèles Alzheimer](#).

Autres modèles animaux Les études du laboratoire ont été les premières à démontrer cette accumulation précoce de C99. Néanmoins, plusieurs études plus récentes confirment cette observation dans d'autres modèles murins de la MA : le modèle APP E693Q (mutation danoise de l'APP) (KAUR et al., 2017), le modèle TgCRND8 (avec les mutations suédoise et indienne de l'APP) (CAVANAGH et al., 2013) et dans le modèle J20 (avec les mutations suédoise et indienne de l'APP) (MONDRAGÓN-RODRÍGUEZ et al., 2018). Cette accumulation de C99 a lieu également dans les modèles de souris *knock-in* APP NL-F (très tardive \approx 18 mois) ou APP NL-F-G (\approx 6 mois) (SAITO et al., 2014). Cette dernière donnée est très importante car elle démontre que le C99 peut s'accumuler même en l'absence de surexpression de l'APP.

3.1.2 Études chez l'Homme

L'étude du C99 dans la maladie d'Alzheimer est assez récente, expliquant des données limitées chez l'Homme. Cependant, les quelques études sur le sujet viennent confirmer les données observées chez les modèles de souris. En effet, des niveaux élevés de C99 ont également été observés en *post-mortem* dans le cerveau de patients atteints de formes familiales ou sporadiques de la MA (cortex frontal et hippocampe) (HÉBERT et al., 2008 ; S. KIM et al., 2016 ; PERA et al., 2013). Néanmoins, les travaux du Dr Pera semblent suggérer que l'accumulation de C99 serait plus forte dans les cas FAD que dans les cas sAD. Deux autres études utilisant des cellules pluripotentes induites (iPSC) — pour "induced Pluripotent Stem Cells" —¹ qui expriment des mutations FAD ont confirmé l'accumulation de C99 chez l'Homme (HUNG et LIVESEY, 2018 ; KWART et al., 2019). De manière intéressante, ces études montrent non seulement que le C99 peut s'accumuler en l'absence de

1. cellules obtenues après reprogrammation génétique d'une cellule adulte spécialisée afin de la rendre pluripotente, c'est-à-dire capable de se multiplier à l'infini et de se différencier en n'importe quel type cellulaire (Shinya Yamanaka, Prix Nobel 2012)

surexpression mais également mettent en évidence l'implication du C99 dans le dysfonctionnement endolysosomal (voir la section [4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer](#)). D'autre part, les travaux du Dr Garcia-Ayllon proposent également la présence d'APP-CTFs dans le LCR de patients Alzheimer, bien que l'identification de ces APP-CTFs reste à discuter (GARCÍA-AYLLÓN et al., 2017). Enfin, une étude récente réalisée par l'équipe du Dr Greengard et basée sur l'analyse de plusieurs aires cérébrales, montre à nouveau l'accumulation du C99 chez des patients souffrant de formes sporadiques de la MA et montre un lien entre cette accumulation (mais pas celle d'A β) et la vulnérabilité cellulaire (PULINA et al., 2019)).

Les données chez l'Homme sont synthétisées dans la [Table 13.3](#).

L'accumulation anormale du C99 est un marqueur de la maladie d'Alzheimer chez l'Homme et semble se produire avant celle de l'A β . Ces données renforcent l'idée que le C99 pourrait être impliqué dans l'étiologie de la MA et pourrait aussi être utilisé comme un biomarqueur.

3.2 La neurotoxicité du C99 et maladie d'Alzheimer

De par ses caractéristiques, (1) contenant la séquence de l'A β et (2) sa localisation dans les compartiments endolysomaux et autophagiques, le fragment C99 a été suggéré comme jouant un rôle toxique dans la maladie d'Alzheimer. La synthèse des données concernant la toxicité précoce du C99 a donné lieu à l'écriture d'une revue à laquelle j'ai participé et publiée dans le journal *Current Alzheimer Research* : "Does Intraneuronal Accumulation of Carboxyl-terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease?". Cette revue sera présentée en deuxième partie de ce chapitre.

3.2.1 Études initiales

De façon similaire à l'A β , les premières études sur le fragment C99 se sont intéressées à sa cytotoxicité *in vitro* et ont démontré d'une part des effets cytotoxiques comparables à ceux induits par l'A β mais également la même capacité d'agrégation, conduisant à la formation de fibrilles dans plusieurs modèles (YANKNER et al., 1989 ; MARUYAMA et al., 1990 ; WOLF et al., 1990 ; DYRKS et al., 1993). La toxicité du C99 a ensuite été montrée *in vivo* grâce des approches distinctes présentées dans la suite de ce paragraphe.

Bien avant la génération des souris AAV-C99, plusieurs modèles transgéniques ont été créés pour étudier la toxicité du C99. Le premier modèle murin a été développé par l'équipe du Dr Neve et est basé sur la transplantation de cellules surexprimant le C100 (séquence du C99 plus l'ajout d'une méthionine en N-terminal) dans le cerveau de souris nouveaux-nés. Ce modèle présente une atrophie cérébrale et des dysfonctionnement synaptiques (NEVE et al., 1996 ; KAMMESHEIDT et al., 1992). Cette stratégie a ensuite été utilisée dans plusieurs souches de souris et sous le contrôle de différents promoteurs, et a permis de mettre en évidence l'apparition de plusieurs caractéristiques de la MA comme la neuroinflammation, les défauts mitochondriaux, les défauts synaptiques et comportementaux (OSTER-GRANITE et al., 1996 ; NALBANTOGLU et al., 1997). La majorité de ces modèles développent également une neurodégénérescence. Néanmoins ils présentent des inconvénients majeurs : (1) l'expression du C99 reste relativement faible, (2) son accumulation est assez tardive et (3) ne permettent pas de discriminer entre l'effet direct du C99 et ceux de ses produits de clivage (A β ou AICD), dus à l'activité de la γ -sécrétase endogène. La toxicité du C99 a également été démontrée dans différents modèles murins de la MA présentant une accumulation précoce de C99, le cas des souris 3xTg-AD et des souris AAV-C99 est détaillé dans la revue. À nouveau, l'inconvénient de ces modèles est l'impossibilité de différencier, à partir d'un certain âge, l'effet du C99 et l'effet de ses catabolites (A β et AICD). Comme présenté auparavant, un des outils pour étudier spécifiquement la contribution du C99, indépendamment de l'A β est l'utilisation d'inhibiteur pharmacologiquement de la γ -sécrétase, bloquant son activité. Un autre outil important est le modèle 2xTg-AD (hAPP^{swe}, hMAPT P301L), développé au laboratoire par le croisement de souris sauvages avec les souris 3xTg-AD. Pour rappel, ces souris ont une accumulation similaire du C99 mais elles ne présentent que très peu d'A β , en comparaison avec les 3xTg-AD.

Remarque 12 : Défauts mitochondriaux et C99

Les mitochondries sont des organites indispensables à la cellule, impliquées entre autres dans la production d'énergie sous forme d'ATP. Cette fonction repose sur le fonctionnement de la chaîne respiratoire, induisant un gradient de protons et une différence de potentiel membranaire. En plus des endosomes et lysosomes, le C99 est retrouvé dans les membranes du RE associées aux mitochondries (MAM). En condition normale, il est rapidement métabolisé par la γ -sécrétase dont l'activité est enrichie dans ce compartiment. Cependant, dans les modèles Alzheimer, l'accumulation de C99 dans les MAM entraîne une altération de la fonction mitochondriale. Plus précisément, cette accumulation conduit à une augmentation de la production de céramides dans ces membranes, ces lipides vont ensuite s'intégrer aux mitochondries et perturber l'assemblage et l'activité de la chaîne respiratoire. Ce dysfonctionnement participe aux défaut d'énergie associés à la MA (SCHON et AREA-GOMEZ, 2013 ; AREA-GOMEZ et SCHON, 2017 ; DEL PRETE et al., 2017).

3.2.2 Revue récapitulative

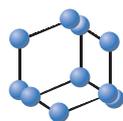
Cette revue fait un état des lieux des travaux récents ayant montrés la toxicité du C99 dans le contexte de la maladie d'Alzheimer. Elle est majoritairement centrée sur les résultats obtenus dans les modèles 3xTg-AD et AVV-C99 que nous utilisons au laboratoire. Cette revue permet de mettre en évidence l'effet toxique de l'accumulation du C99 sur (1) la fonction endosolysosomale et autophagique, décrite initialement par l'équipe du Dr Nixon et mon équipe d'accueil respectivement, (2) la réponse immunitaire au niveau du cerveau, illustrée par une activation des microglies et une astrogliose, et (3) les fonctions synaptiques et cognitives, incluant des altérations de la potentialisation à long terme, de la mémoire, des circuits neuronaux et la neurodégénérescence. De plus, des études chez l'Homme viennent confirmer l'implication du C99 dans le dysfonctionnement endolysosomal et son potentiel rôle dans la neurodégénérescence. Le dysfonctionnement EAL induit par le C99 est la caractéristique la plus documentée à l'heure actuelle. L'ensemble de ces données suggère donc un rôle central du C99 dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer, en raison de son accumulation précoce et ses effets toxiques sur plusieurs mécanismes cellulaires.

La [Table 13.4](#) vient compléter cette revue en récapitulant de façon plus large l'ensemble des données ayant montré la toxicité du C99.

L'ensemble de ces travaux, démontrant la toxicité du C99 dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, suggère fortement qu'une réduction des niveaux de C99 dans le cerveau pourrait retarder/empêcher l'apparition des phénotypes délétères associés à l'accumulation précoce de ce fragment.

REVIEW ARTICLE

Does Intraneuronal Accumulation of Carboxyl-terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease?



**BENTHAM
SCIENCE**

I. Lauritzen, R. Pardossi-Piquard, A. Bourgeois, A. Bécot and F. Checler^{1,*}

IPMC, UMR7275 CNRS/UNS, Laboratory of Excellence DistALZ, 660 route des Lucioles, 0660 Valbonne, France

Abstract: Background: Alzheimer's disease (AD) is associated with extracellular accumulation and aggregation of amyloid β (A β) peptides ultimately seeding in senile plaques. Recent data show that their direct precursor C99 (β CTF) also accumulates in AD-affected brain as well as in AD-like mouse models. C99 is consistently detected much earlier than A β , suggesting that this metabolite could be an early contributor to AD pathology. C99 accumulates principally within endolysosomal and autophagic structures and its accumulation was described as both a consequence and one of the causes of endolysosomal-autophagic pathology, the occurrence of which has been documented as an early defect in AD. C99 was also accompanied by C99-derived C83 (α CTF) accumulation occurring within the same intracellular organelles. Both these CTFs were found to dimerize leading to the generation of higher molecular weight CTFs, which were immunohistochemically characterized *in situ* by means of aggregate-specific antibodies.

Discussion: Here, we discuss studies demonstrating a direct link between the accumulation of C99 and C99-derived APP-CTFs and early neurotoxicity. We discuss the role of C99 in endosomal-lysosomal-autophagic dysfunction, neuroinflammation, early brain network alterations and synaptic dysfunction as well as in memory-related behavioral alterations, in triple transgenic mice as well as in newly developed AD animal models.

Conclusion: This review summarizes current evidence suggesting a potential role of the β -secretase-derived APP C-terminal fragment C99 in Alzheimer's disease etiology.

Keywords: Alzheimer's disease, C99, C83, C-terminal APP fragments, dimerization, endolysosomal-autophagic dysfunction, synaptic defects, brain network alterations, memory-related behavior, animal models.

1. INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of dementia observed in western populations. A consistent histological feature of AD-affected brains is the extracellular accumulation of abnormal protein deposits mainly composed of aggregated A β . When autosomal dominant mutations in APP were shown to trigger early and aggressive forms of AD and when cell biology approaches indicated that these mutations systematically triggered modulations of A β production or yielded aggregation-prone A β species, the amyloid cascade hypothesis was proposed, in which A β is at the center of gravity [1, 2]. A β peptides are generated by sequential processing of the transmembrane amyloid precursor protein (APP) by β - and γ -secretases [3]. First, APP is cleaved by β -secretase generating the membrane-bound fragment C99 (also referred to as β CTF), which then undergoes a secondary cleavage by γ -secretase leading to the release of soluble A β peptides. This sequence of proteolytic events is

considered as the amyloidogenic pathway. γ -secretase is a membrane protein complex composed of Aph-1, Pen-2, nicastrin and presenilins (1 and 2) [4] and mutations in both *PSEN1* and more rarely *PSEN2* genes, encoding presenilin 1 and presenilin 2, respectively, are known to cause familial AD [5]. Transgenic mouse models harboring mutated APP and/or mutated presenilins present age-dependent extracellular amyloid deposits and other AD-related anatomical stigmata. Mounting data indicate that not only A β , but also other catabolites of APP accumulate in the AD brain, and our previous work, based on the 3xTgAD (APP^{swe}, PS1M106V, TauP301L) mouse model [6], indicated a particularly strong age-dependent intraneuronal accumulation of the C99 fragment, the direct precursor of A β [7]. In the 3xTgAD mouse, C99 accumulation occurs in specific AD-related brain areas (hippocampus and cortex) and appears at very early stages much before the occurrence of any detectable A β . Importantly, works from other groups later confirmed this early intraneuronal C99 accumulation in several other mouse models, including the APP^{E693Q} (Dutch mutation) expressing mouse [8], the TgCRND8 (Swedish and Indiana mutations) mouse [9] and the J20 mouse (Swedish and Indiana mutations) [10]. Thus, C99 accumulation appears as a common

*Address correspondence to this author at the IPMC, UMR7275 CNRS/UNS, Laboratory of Excellence DistALZ, 660 route des Lucioles, 0660 Valbonne, France; Tel: 33493953460; E-mail: checler@ipmc.cnrs.fr

anatomical and biochemical denominator in AD mice models and could well be envisioned as an etiological trigger of AD pathology.

2. C99 ACCUMULATION IS BOTH A CONSEQUENCE AND A CAUSE OF EARLY LYSOSOMAL-AUTOPHAGIC DYSFUNCTION AND IS ASSOCIATED WITH NEUROINFLAMMATION

Growing evidence indicates that a dysfunction in the endolysosomal and autophagic system is one of the earliest key events in AD. This pathology is reflected by the early appearance of morphologically and functionally abnormal endosomes, upregulated hydrolase levels and a progressive failure of lysosomal and autophagic degradation ultimately leading to the build-up of undigested autophagic vesicles [11]. It is well documented that most mouse models recapitulate these anomalies [12-14] and several studies have shown that lysosomal and/or autophagic activation can have a beneficial impact on AD pathology in these models [15-20]. Our work showed that C99 mainly accumulates within endosomal, lysosomal and autophagic structures [7, 14], which also correspond to the principal intracellular sites for amyloidogenic APP processing [21]. We found that C99 accumulation in the 3xTgAD mouse did not result from either increased β -secretase or reduced γ -secretase cleavages, but was rather due to early lysosomal impairment [7]. Indeed, C99 accumulation was similar in 3xTgAD and 2xTgAD (APP^{swe}, TauP301L) mice, although the latter displayed little if any A β as expected from the absence of mutated presenilin-1 [7]. In agreement with lysosomal dysfunction in both mouse strains, C99 accumulated within abnormally large cathepsins- and lamp-positive structures, which number was also increased in C99-positive neurons [7]. Our data from mouse models indicated that C99 accumulation itself could contribute to this pathology. Indeed, the pharmacological inhibition of γ -secretase in young animals not only led to increased C99 levels (and C99-derived APP-CTFs, see below) but also to exacerbated lysosomal impairment [14]. Strikingly, the group of Dr Levy drew the same conclusions from a study based on a transgenic mouse model harboring the Dutch mutation, the APP^{E693Q} mouse [8]. As in the 3xTgAD mouse, C99 accumulation was observed within enlarged LAMP-1, LAMP-2 and cathepsin D-positive structures and the number of these structures was strongly increased in C99-positive cells [14]. These findings showed that C99 alters lysosomal function in addition to its earlier reported deleterious effects on endosomal dysfunction [22]. For instance, in fibroblasts from Down's syndrome, a cause of early-onset AD-like pathology due to an extra copy of APP, C99 was found to accumulate within early endosomes and cause both morphological and functional endosomal abnormalities, including up-regulated expression of endocytic proteins, aberrant endocytosis and impaired endosomal transport [22]. These deleterious effects were reversed in cells treated with a β -secretase inhibitor, but increased in the presence of a γ -secretase inhibitor, demonstrating that C99 but not A β should underlie these abnormalities [22]. We and the group of Dr Levy also found that this intraneuronal accumulation is associated with microglial activation and astrogliosis [14]. These inflammatory responses were particularly important in γ -secretase inhibitor-treated mice (displaying little if any A β

and high APP-CTF levels) demonstrating that inflammation was indeed linked to C99 accumulation [14]. Again, the group of Dr Levy, working on the APP^{E693Q} mouse, came to the same conclusion, since neuroinflammation in these mice appeared at very early ages before any A β detection [8]. These observations are in agreement with more general conclusions linking intraneuronal accumulation of biologically inactive aggregated proteins to neuroinflammatory activation [23].

3. C99 ACCUMULATION EXACERBATES C99-DERIVED C83 PRODUCTION AND GENERATES HIGH MOLECULAR WEIGHT APP-CTFS

Our data showed that the major accumulating intraneuronal immunostaining corresponded to C99, however our work also indicated that part of it could correspond to C83. This catabolite mainly arises from non-amyloidogenic processing of APP by α -secretase, which occurs primarily on the plasma membrane. However, this apparently paradoxical observation could be explained by the susceptibility of C99 itself to proteolysis by α -secretase [24] and suggests that α -secretase activity should also be efficient within organelles of the endolysosomal system. Particularly high C99-derived C83 levels were found in animals treated with γ -secretase inhibitors, indicating that γ -secretase inhibition not only protected endogenous C83 from γ -secretase-mediated breakdown, but also somehow favored the cleavage of C99 by α -secretase, as previously observed [25, 26]. Beside C99 and C83, expression analysis revealed the presence of high-molecular weight APP-CTFs in cells or brain tissue accumulating high levels of C99. We observed these APP-CTFs in cells expressing APP bearing the Swedish mutation [14], which favors the β -secretase cleavage of APP but also in cells expressing directly the C99 fragment (unpublished data), indicating that these APP-CTFs derived directly from C99 and did not correspond to other putative APP-derived metabolites of higher molecular weight. In this context, recent work has focused on the η -secretase-derived APP cleavage product, APP-CTF η [27, 28]. Indeed, this 30 kDa APP-CTF can be detected with anti-APP C-terminal antibodies and it has a size close to one of the high-molecular weight APP-CTFs observed in our study. We hypothesized that this 30 kDa fragment could correspond to homodimers of C99, since several *in vitro* studies have shown that C99 can form homodimers [29]. This homodimerization is favored by three glycine-xxx-glycine (GxxxG) motifs in the juxtamembrane and transmembrane regions of C99 [29], but its influence on γ -secretase-mediated APP processing remains controversial. It was reported that C99 homodimerisation hampered γ -secretase cleavage thus lowering A β production [30], while others reported on increased cleavage yielding enhanced A β production [29]. Interestingly, it was also found that cholesterol can bind to C99 and compete with it, leading to a reduced homodimerization and increased A β production [31]. Besides the 30 kDa APP-CTF, we also observed the presence of additional high molecular weight APP-CTFs. Although never reported so far, our findings suggested that these immunoreactivities could correspond to homodimers of C99 or C83, heterodimers of C99 and C83, as well as heterodimers of other APP-CTFs and cholesterol bound APP-CTFs. Of note, these APP-CTFs

were recognized *in situ* in our mouse models by the aggregate-specific antibodies NU1 and NU4 [32] indicating that these APP-CTFs could well harbor an “aggregate-like” conformation within the endolysosomal-autophagic vesicle membranes [14]. Further immunological characterization of this intracellular staining revealed that these high molecular weight species *in situ* were not recognized by APP C-terminal directed antibodies, suggesting that dimer formation induces a conformation change precluding their C-terminal epitope accessibility/interaction and antibody recognition. Immunostaining with NU1 showed an increased intracellular staining in brains of γ -secretase inhibitor-treated mice indicating that the label could not be accounted for by aggregated A β , since the levels of A β were very low in these animals [14]. Thus, our work revealed the early occurrence and accumulation of intraneuronal monomeric and dimeric APP-CTFs, but was also the first study to document the accumulation of C99-derived C83 and higher molecular weight APP-CTFS (dimers), *in situ* within the same intracellular structures. One could speculate that either alone or after physical interaction, these species could cooperate to trigger neurotoxic phenotypes.

4. BRAIN NETWORK OR SYNAPTIC ALTERATIONS CAN BE LINKED TO EARLY C99 ACCUMULATION

Several lines of evidence highlighted hippocampal synaptic dysfunction as a cause of memory impairment in AD [33]. In animal models, this impaired synaptic function appears as an early event and leads to defects in memory much before the appearance of amyloid plaques and neuronal degeneration [34]. In particular, AD has been associated with defects in synaptic transmission, long-term potentiation (LTP) and long-term depression (LTD), which are thought to underlie the cellular mechanisms of learning behavior and memory consolidation. Mounting evidence suggests that these synaptic defects are triggered by soluble A β oligomers and much effort in recent years has been made to identify the receptors and signaling pathways implicated in oligomer-induced toxic effects [35]. Thus, A β was found to bind to receptors for glutamate, nicotinic acetylcholine, cellular prion protein, neurotrophins (p75NTR) and ephrin among others [36]. In order to study the implication of C99 in synaptic alterations, we recently analyzed hippocampal LTP in C99-expressing mice (AAV-mediated C99 expression) [14]. Indeed, our results indicated that hippocampal LTP was significantly reduced in young C99-expressing mice, as compared to control mice infected with control virus. The inhibition of γ -secretase did not rescue LTP alterations indicating that C99 rather than A β mediated these effects [14]. In agreement with these findings, two lines of independent observations also indicated that the hippocampal LTP alterations observed in the 3xTgAD mouse (at least at the early stages of the pathology) should likely be linked to C99. Firstly, the synaptic alterations were temporally and spatially correlated with C99 accumulation [37]. Secondly, these electrophysiological modifications were identical in the 2xTgAD (APP^{swe}, TauP301L), which accumulate similar levels of C99, while A β levels remain poorly detectable in this mouse model [38]. Moreover, it was found that spatial learning (using the Morris water maze test) was altered in both the 2xTgAD and 3xTgAD mice, as compared to control mice,

although with a higher impact in the 3xTgAD mice, indicating that both C99 and A β could well contribute to these alterations [38]. Recently, it was proposed that memory impairment is not only explained by LTP/LTD defects, but is also associated with changes in brain circuits and network activities reflected by hyperexcitability and spontaneous epileptiform activity [39]. These alterations were also suggested to be triggered by pathological A β oligomers. Nevertheless, a number of recent works demonstrated that network alterations appeared at very early stages much before A β detection, proposing that other candidates could be responsible for these electrophysiological alterations. For instance, the group of Dr William observed alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling in the subiculum of the hippocampus of the TgCRND8 AD mouse brain, at early “A β -free” stages [40]. Later work from the same group demonstrated similar electrophysiological alterations in young J20 mice and these abnormalities were correlated with early C99 accumulation, rather than with A β accumulation. Of importance, the treatment with a β -secretase inhibitor (that fully prevented C99 formation) was found to rescue these alterations demonstrating that they should be directly linked to C99 [10].

CONCLUSION

There is a growing body of evidence suggesting a critical role of C99 in Alzheimer disease mouse model neuropathology. The possibility that C99 contributes to AD etiology independently of A β is supported by C99-induced endosome and lysosome dysfunction, neuroinflammation and electrophysiological alterations in various mouse models at early stages of the pathology, at which little if any A β is detectable. Since at least some of these alterations are also documented in human pathology, one may speculate on a possible role of C99 accumulation also in human AD. So far, most studies have focused on A β and have been performed at the end-stages of the disease, at which initial C99 toxicity may be overtaken by late A β accumulation and toxicity. Nevertheless, some papers indeed reported significantly elevated C99 levels in human AD brain tissue as compared to control brains [41-43], indicating that C99 accumulation also occurs in human pathology and can be monitored also at late stage of the disease. Our data indicating that C99 accumulation is linked to a defective lysosomal-autophagic clearance and that this accumulation *per se* contributes to this pathology, proposes that early lysosomal activation could constitute a therapeutic strategy to fight against AD. Our data also strongly arguments against γ -secretase inhibition as a therapeutic strategy for the treatment of AD and are supported by previous studies demonstrating toxicity linked to the absence or low γ -secretase activity. For instance, the conditional knock-out of presenilin1 in mice was found to lead to a progressive development of synaptic and cognitive alterations that were temporally correlated with APP-CTF accumulation [44]. Consistent with these findings, the treatment with γ -secretase inhibitors was found to induce both long-term deficits and APP-CTF accumulation in mice [45, 46] and to accelerate cognitive decline in human [47]. Furthermore, in these conditions, the accumulation of C99 and other membrane-bound APP-CTFs would be expected to be associated with the accumulation of other membrane-bound pro-

teins (γ -secretase and lysosomal substrates) leading to a traffic jam of non-digested proteins and a general failure of protein turnover [48]. Overall, one can envision an AD setting initiated by C99, while disease progression and late cognitive alterations should be attributed to C99, A β and certainly other APP-derived catabolites [49].

CONSENT FOR PUBLICATION

Not applicable.

FUNDING

This work was supported through the LABEX (excellence laboratory, program of investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease), the Hospital University Federation (FHU) OncoAge and the Fondation Plan Alzheimer. Alexandre Bourgeois and Anaïs Bécot were supported by DISTALZ LABEX grants.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest, financial or otherwise.

ACKNOWLEDGEMENTS

Declared none

REFERENCES

- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 256: 184-85 (1992).
- Selkoe DJ, Hardy J. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8: 595-608 (2016).
- Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 65: 1431-44 (1995).
- Kimberly WT, LaVoie MJ, Ostaszewski BL, Ye W, Wolfe MS, Selkoe DJ. Gamma-secretase is a membrane protein complex comprised of presenilin, nicastrin, Aph-1, and Pen-2. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 6382-87 (2003).
- Kelleher RJ, 3rd, Shen J. Presenilin-1 mutations and Alzheimer's disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 629-31 (2017).
- Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, *et al.* Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* 39: 409-21 (2003).
- Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, *et al.* 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: 16243-15 (2012).
- Kaur G, Pawlik M, Gandy SE, Ehrlich ME, Smiley JF, Levy E. Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry* 22: 981-89 (2016).
- Cavanagh C, Colby-Milley J, Bouvier D, Farso M, Chabot JG, Quirion R, Krantic S. betaCTF-correlated burst of hippocampal TNFalpha occurs at a very early, pre-plaque stage in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 36: 233-38 (2013).
- Mondragon-Rodriguez S, Gu N, Manseau F, Williams S. Alzheimer's transgenic model is characterized by very early brain network alterations and beta-ctf fragment accumulation: reversal by beta-secretase inhibition. *Front Cell Neurosci* 12: 121 (2018).
- Nixon RA. Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J* 31: 2729-43 (2017).
- Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J Biol Chem* 285: 13107-120 (2010).
- Yang DS, Stavrides P, Saito M, Kumar A, Rodriguez-Navarro JA, Pawlik M, *et al.* Defective macroautophagic turnover of brain lipids in the TgCRND8 Alzheimer mouse model: prevention by correcting lysosomal proteolytic deficits. *Brain* 137: 3300-18 (2014).
- Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M, *et al.* Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol* 132: 257-76 (2016).
- Yang DS, Stavrides P, Mohan PS, Kaushik S, Kumar A, Ohno M, *et al.* Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits. *Brain* 134: 258-77 (2010).
- Orr ME, Oddo S. Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 5: 53 (2013).
- Spilman P, Podlutskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, *et al.* Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS One* 5: e9979 (2010).
- Caccamo A, De Pinto V, Messina A, Branca C, Oddo S. Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature. *J Neurosci* 34: 7988-98 (2014).
- Majumder S, Richardson A, Strong R, Oddo S. Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits. *PLoS One* 6: e25416 (2011).
- Caccamo A, Ferreira E, Branca C, Oddo S. p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy. *Mol Psychiatry* 22: 865-73 (2017).
- Pasternak SH, Callahan JW, Mahuran DJ. The role of the endosomal/lysosomal system in amyloid-beta production and the pathophysiology of Alzheimer's disease: reexamining the spatial paradox from a lysosomal perspective. *J Alzheimers Dis* 6: 53-65 (2004).
- Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, Boyer-Boiteau A, *et al.* 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 USA* 107: 1630-35 (2010).
- Currais A, Fischer W, Maher P, Schubert D. Intraneuronal protein aggregation as a trigger for inflammation and neurodegeneration in the aging brain. *FASEB J* 31: 5-10 (2017).
- Jager S, Leuchtenberger S, Martin A, Czirr E, Wesselowski J, Dieckmann M, *et al.* alpha-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Abeta generation. *J Neurochem* 111: 1369-82 (2009).
- Chen AC, Kim S, Shepardson N, Patel S, Hong S, Selkoe DJ. Physical and functional interaction between the alpha- and gamma-secretases: A new model of regulated intramembrane proteolysis. *J Cell Biol* 211: 1157-76 (2015).
- Siegenthaler BM, Bali JB, Rajendran L. γ -secretase regulates the α -secretase cleavage of the Alzheimer's disease, amyloid precursor protein. *Sciencematters* (2016) 10.19185/matters.201601000003.
- Baranger K, Marchalant Y, Bonnet AE, Crouzin N, Carrete A, Paumier JM, *et al.* MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic protease that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 73: 217-36 (2015).
- Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, *et al.* Beta-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 526: 443-47 (2015).
- Kienlen-Campard P, Tasiaux B, Van Hees J, Li M, Huysseune S, Sato T, *et al.* Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs. *J Biol Chem* 283: 7733-44 (2008).
- Winkler E, Julius A, Steiner H, Langosch D. Homodimerization protects the amyloid precursor protein c99 fragment from cleavage by gamma-secretase. *Biochemistry* 54: 6149-52 (2015).
- Song Y, Hustedt EJ, Brandon S, Sanders CR. Competition between homodimerization and cholesterol binding to the C99 domain of the amyloid precursor protein. *Biochemistry* 52: 5051-64 (2013).

- [32] Lambert MP, Velasco PT, Chang L, Viola KL, Fernandez S, Lacor PN, *et al.* Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem* 100: 23-35 (2007).
- [33] Selkoe DJ. Alzheimer's disease is a synaptic failure. *Science* 298: 789-91 (2002).
- [34] Nistico R, Pignatelli M, Piccinin S, Mercuri NB, Collingridge G. Targeting synaptic dysfunction in Alzheimer's disease therapy. *Mol Neurobiol* 46: 572-87 (2012).
- [35] Tanzi RE. The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease. *Nat Neurosci* 8: 977-79 (2005).
- [36] Smith LM, Strittmatter SM. Binding sites for amyloid-beta oligomers and synaptic toxicity. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7: 1-23 (2018).
- [37] Pardossi-Piquard R, Lauritzen I, Bauer C, Sacco G, Robert P, Checler F. Influence of genetic background on apathy-like behavior in triple transgenic AD mice. *Curr Alzheimer Res* 13: 942-49 (2016).
- [38] Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, Bauer C, Checler F, Pardossi-Piquard R. Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice. *Neurobiol Aging* 71: 21-31 (2018).
- [39] Verret L, Mann EO, Hang GB, Barth AM, Cobos I, Ho K, *et al.* Inhibitory interneuron deficit links altered network activity and cognitive dysfunction in Alzheimer model. *Cell* 149: 708-21 (2012).
- [40] Goutagny R, Gu N, Cavanagh C, Jackson J, Chabot JG, Quirion R, *et al.* Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before Abeta overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* 37: 1896-1902 (2013).
- [41] Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silaharoglu AN, *et al.* Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 105: 6415-20 (2008).
- [42] Pera M, Alcolea D, Sanchez-Valle R, Guardia-Laguarta C, Colom-Cadena M, Badiola N, *et al.* Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 125: 201-13 (2013).
- [43] Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A, Rigoglioso A, *et al.* 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 (2016).
- [44] Saura CA, Chen G, Malkani S, Choi SY, Takahashi RH, Zhang D, *et al.* Conditional inactivation of presenilin 1 prevents amyloid accumulation and temporarily rescues contextual and spatial working memory impairments in amyloid precursor protein transgenic mice. *J Neurosci* 25: 6755-64 (2005).
- [45] Mitani Y, Yarimizu J, Saita K, Uchino H, Akashiba H, Shitaka Y, *et al.* Differential effects between gamma-secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J Neurosci* 32: 2037-50 (2005).
- [46] Tamayev R, D'Adamio L. Inhibition of gamma-secretase worsens memory deficits in a genetically congruous mouse model of Danish dementia. *Mol Neurodegener* 7: 19 (2012).
- [47] Doody RS, Raman R, Farlow M, Iwatsubo T, Vellas B, Joffe S, *et al.* A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *N Engl J Med* 369: 341-50 (2013).
- [48] Sambamurti K, Suram A, Venugopal C, Prakasam A, Zhou Y, Lahiri DK, *et al.* A partial failure of membrane protein turnover may cause Alzheimer's disease: a new hypothesis. *Curr Alzheimer Res* 3 81-90 (2006).
- [49] Dunys J, Valverde A, Checler F. Are N- and C-terminally truncated Abeta species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *J Biol Chem* 293: 15419-28 (2018).

Deuxième partie

Modulation de l'autophagie : une nouvelle stratégie thérapeutique pour la maladie d'Alzheimer ?

Défauts de clairance dans la maladie d'Alzheimer

” *We need to believe ourselves. We need to believe that scientific approaches to this problem are going to help. The brain is an organ. It's a very difficult organ, a very fascinating organ, but it's made from the same components as all other body parts, and it's governed by the same principles. So if you can find drugs for cancer, if you can find drugs for heart disease and diabetes, etc., then you should find it for brain disorders, too*

— **Bart De Strooper**
VIB- KU Leuven

Les deux formes de la maladie d'Alzheimer, familiale et sporadique, se différencient par leur cinétique d'apparition et leurs causes, en particulier l'origine de l'accumulation de l'A β . En effet, les formes génétiques se caractérisent par une augmentation de la production de l'A β alors que les formes sporadiques semblent liées à une réduction importante de sa clairance. De plus, il est maintenant établi que les systèmes de dégradation de la cellule sont de moins en moins efficaces avec l'âge, qui est le principal facteur de risque dans la MA. Il est donc important de comprendre dans les grandes lignes comment s'effectue la clairance de l'A β et du C99 en condition normale, et surtout d'identifier les altérations associées à la MA en rapport avec les systèmes de dégradation des neurones.

4.1 La clairance du peptide $A\beta$

Aujourd'hui, plusieurs mécanismes sont connus comme étant impliqués dans la clairance du peptide $A\beta$, qu'ils soient en intracellulaire ou en extracellulaire, sous forme monomérique ou oligomérique, soluble ou non. Ces mécanismes impliquent des enzymes hydrolysant directement le peptide $A\beta$, le système immunitaire du cerveau ou les systèmes de dégradation cellulaire. Cette clairance peut s'opérer directement au niveau du cerveau mais également dans les organes périphériques, le foie et le rein principalement. En réalité, cette dégradation en périphérie est loin d'être anecdotique puisqu'elle représente près de la moitié de la clairance du peptide $A\beta$. Cependant, cette dernière nécessite le transport de l' $A\beta$ hors du cerveau, effectué grâce au système vasculaire ou lymphatique (NALIVAEVA et TURNER, 2019). Le passage à travers la barrière hémato-encéphalique se fait notamment grâce à la protéine APOE et différents transporteurs (GLUT 1/ABCB1, LRP 1, PICALM...) (RIES et SASTRE, 2016 ; XIN et al., 2018). Plusieurs de ces protéines sont diminuées dans les cerveaux de patients Alzheimer, altérant le passage de l' $A\beta$ à travers la BHE et donc sa clairance.

4.1.1 Enzymes hydrolysant l' $A\beta$

Une vingtaine de protéases a été identifiée comme participant à la dégradation de l' $A\beta$. Ce sont principalement des métalloprotéinases, qui ne sont pas spécifiques du peptide $A\beta$. Les plus connues sont la néprilysine (NEP), qui est l'enzyme majoritaire dans la dégradation de l' $A\beta$ sous forme monomérique ou oligomérique, l'enzyme de dégradation de l'insuline (IDE) — pour "Insulin-Degrading Enzyme" —, l'enzyme de conversion de l'endothéline 1 et 2 (ECE) — pour "Endothelin Converting Enzyme" —, les métalloprotéinases matricielles (MMP) et la plasmine, enzyme dérivée du plasminogène inactif. Ces enzymes sont spécifiques, en fonction de leur nature, de la dégradation intracellulaire et/ou extracellulaire de l' $A\beta$. De plus, elles sont fortement exprimées dans le foie et les reins, ces organes participant ainsi à la clairance de l' $A\beta$ formé au niveau cérébral. Elles agissent également dans le cerveau, au niveau des neurones, des microglies et des astrocytes (SIKANYIKA et al., 2019) (voir Figure 4.1). Les niveaux de certaines de ces enzymes sont diminués chez les patients Alzheimer, notamment la NEP, l'IDE ou la plasmine. Cependant, ces protéases sont spécialisées dans le clivage de fragments solubles et

de courte taille, elles ne peuvent donc pas reconnaître le C99 qui est une protéine transmembranaire.

4.1.2 Dégradation par les microglies et les astrocytes

Les cellules immunitaires résidentes dans le cerveau participent également à la clairance de l'A β . En effet, les microglies et les astrocytes sont capables de se lier à l'A β extracellulaire et d'induire l'internalisation du peptide, qui sera ensuite dégradé par les protéases citées précédemment (NEP, IDE, plasminogène) ou par le système lysosomal-autophagique (voir [Figure 4.1](#)). Cette internalisation fait intervenir différents mécanismes en fonction de la forme sous laquelle est le peptide A β : par pinocytose (A β soluble), par phagocytose (A β fibrillaire) ou par endocytose médiée par des récepteurs (A β soluble et fibrillaire). Cette dernière, qui est la voie principale, implique différents récepteurs situés à la membrane des cellules gliales. Un des plus étudiés dans le contexte de la MA est le récepteur TREM2 — pour "Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2" —, qui est exprimé par les microglies. En effet, certains variants génétiques de TREM2 ont récemment été identifiés comme étant des facteurs de risque pour les formes tardives de la MA et les niveaux microgliaux de ce récepteur seraient diminués chez les patients Alzheimer. Au contraire, des taux élevés de TREM2 seraient protecteurs contre la MA (EWERS et al., 2019). En ce sens, l'équipe du Dr Haas se concentre donc sur cette cible comme stratégie thérapeutique contre la MA (AD/PD 2019). Il a également été montré que les microglies participent à la clairance de l'A β au niveau de cerveau *via* la capture de vésicules sécrétées par les neurones, appelées exosome, et qui pourraient contenir l'A β (voir [8 Exosomes et les maladies neurodégénératives](#)). L'internalisation d'A β induit ensuite la libération d'espèces oxygénées réactives (ROS) et de cytokines pro-inflammatoires (TNF α , IL6, IL1 β ...) participant à la neuroinflammation, dont le rôle s'avèrerait plutôt bénéfique dans un premier temps. Les microglies semblent changer de phénotype au fur et à mesure de la progression de la pathologie, passant du phénotype M1 pro-inflammatoire protecteur à un phénotype M2 délétère, où les microglies perdent leur capacité à phagocyter l'A β et se mettent à produire des cytokines anti-inflammatoires (TGF β , IL4...), induisant une inflammation chronique. Les astrocytes subiraient une conversion phénotypique similaire à celle des microglies (RIES et SASTRE, 2016). À nouveau, le C99 étant un fragment ancré à la membrane, il n'y a pas de raison à première vue qu'il soit

phagocyté par les cellules gliales, sous cette forme "libre". Cet aspect sera discuté dans la partie [III Les exosomes : un rôle dans la maladie d'Alzheimer ?](#).

4.1.3 Dégradation par le système ubiquitine-protéasome

Cette voie catabolique, dépendante de l'ATP, prend en charge des protéines à demi-vie courte, endommagées ou mal repliées. Elle nécessite l'ubiquitinylation de la protéine cible, qui sera adressée vers le complexe du protéasome où elle sera dégradée. Plusieurs groupes ont montré que l'APP peut être ubiquitinylée, en particulier au niveau de 3 lysines situées dans la séquence correspondante aux APP-CTFs, suggérant sa dégradation par l'UPS (E. MOREL et al., 2013 ; WATANABE et al., 2012 ; EL AYADI et al., 2012). Néanmoins, la dégradation de l'A β et du C99 par l'UPS reste encore controversée, en raison du manque de certitudes quant à l'ubiquitinylation même des fragments produits (H. WANG et SAUNDERS, 2014). Certaines études proposent toutefois une relation bidirectionnelle entre l'A β et l'UPS dans la MA : un défaut de dégradation par l'UPS entrainerait une accumulation anormale d'A β alors que les oligomères d'A β inhiberait l'activité protéasomale (HONG et al., 2014). De même, quelques études suggèrent que le C99 peut être dégradé par le protéasome (EVRARD et al., 2018 ; NUNAN et al., 2001 ; NUNAN et al., 2003 ; BUSTAMANTE et al., 2013). Néanmoins, dans ces expériences, il n'est pas précisé si la construction contient bien le peptide d'adressage vers les membranes, qui est nécessaire pour la dégradation endolysosomale, décrite également comme une voie de dégradation de l'A β dans le cerveau. D'autre part, le système UPS semble plus efficace pour la dégradation des protéines agrégées dans les cellules gliales que dans les neurones. Au vu de ces données, le rôle de l'UPS dans la clairance de l'A β et du C99 reste à élucider. Cependant, il est maintenant admis que l'activité du système UPS, de façon générale, est altérée au cours de la maladie d'Alzheimer.

En conclusion, les différents mécanismes décrits dans cette partie et impliqués dans la clairance de l'A β ne semblent donc pas adaptés pour la clairance du C99, qui est un fragment membranaire. De ce fait, la 2^e voie de dégradation de la cellule, la voie endosomale-lysosomale-autophagique, ap-

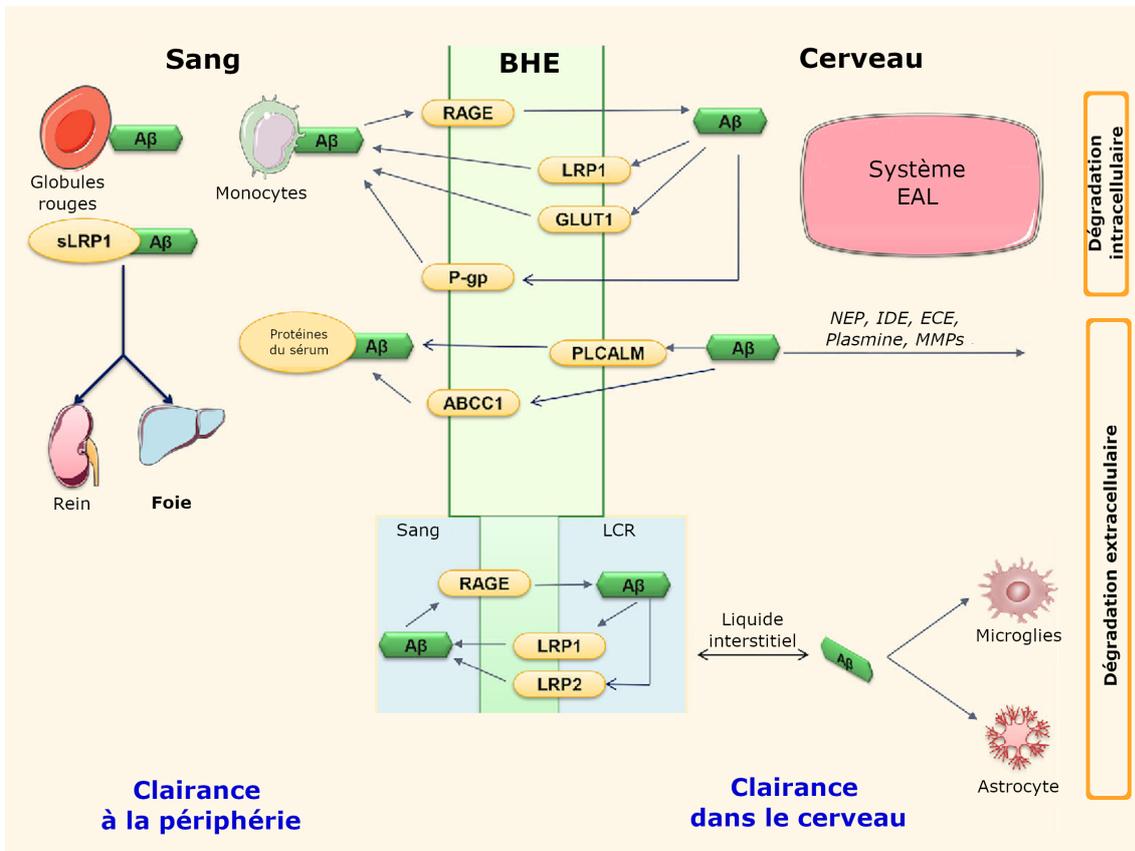


Figure 4.1.: Clairance de l'A β dans le cerveau et à la périphérie

En condition physiologique, l'élimination de l'A β se fait pour la moitié dans le cerveau et le reste à la périphérie après transport *via* la barrière hématoencéphalique (BHE). Au niveau du cerveau, elle se fait grâce à la combinaison de 3 acteurs principaux : des enzymes dégradant directement l'A β (NEP, IDE...), le système lysosomal-autophagique et les cellules immunitaires résidentes (microglies et astrocytes). Après passage dans le sang, il peut être dégradé *in situ* par les globules rouges et les monocytes, ou rejoindre les reins et le foie, où sont fortement exprimées les enzymes hydrolysant l'A β . (Source : XIN et al., 2018)

paraît comme celle majoritairement impliquée dans la clairance du C99. La description de cette voie constitue la partie suivante.

4.2 Les voies de dégradation endosomale-lysosomale-autophagique (EAL)

Comme présenté dans la section 2.3 [Le trafic intracellulaire](#), l'APP possède dans sa séquence protéique différents motifs de triage, dont un motif d'adressage vers les lysosomes qui est également présent sur la séquence du C99, permettant l'adressage de ces protéines vers les lysosomes. Cette caractéristique suggère donc la clairance du fragment C99 par la voie endosomale-lysosomale-autophagique (EAL). Dans la littérature, cette voie est souvent décrite en séparant d'un côté la voie endosomale et de l'autre la voie autophagique. Cependant, ces deux voies sont en réalité interconnectées et peuvent converger, par fusion des vésicules endosomales avec les vésicules autophagiques (voir [Figure 4.2](#)). Les mécanismes cellulaires et moléculaires impliqués dans ces deux voies sont décrits dans la suite de ce manuscrit.

4.2.1 Rôle central des lysosomes

Décrits pour la première fois en 1955 par Christian De Duve, les lysosomes sont des organites vésiculaires de quelques nanomètres de diamètre (100-500nm) impliqués dans la dégradation et le recyclage des déchets cellulaires (de DUVE et al., 1955). Leur importance dans la cellule est telle que leur découverte a valu à Christian Duve le prix Nobel de médecine en 1974. En effet, les lysosomes sont capables de dégrader une grande variété d'éléments, extracellulaires ou intracellulaires, de nature différentes (protéines, lipides, sucres, acides nucléiques, organites), en surnombre, dysfonctionnels ou potentiellement dangereux. De ce fait, **les lysosomes sont au carrefour de la voie endosomale et de la voie autophagique**. Plus précisément, le matériel extracellulaire ou membranaire rejoint le lysosome après endocytose alors que le matériel intracellulaire est pris en charge au cours d'un processus, appelé autophagie. Dans les deux cas, le lysosome est l'étape ultime pour la dégradation (voir [Figure 4.2](#)).

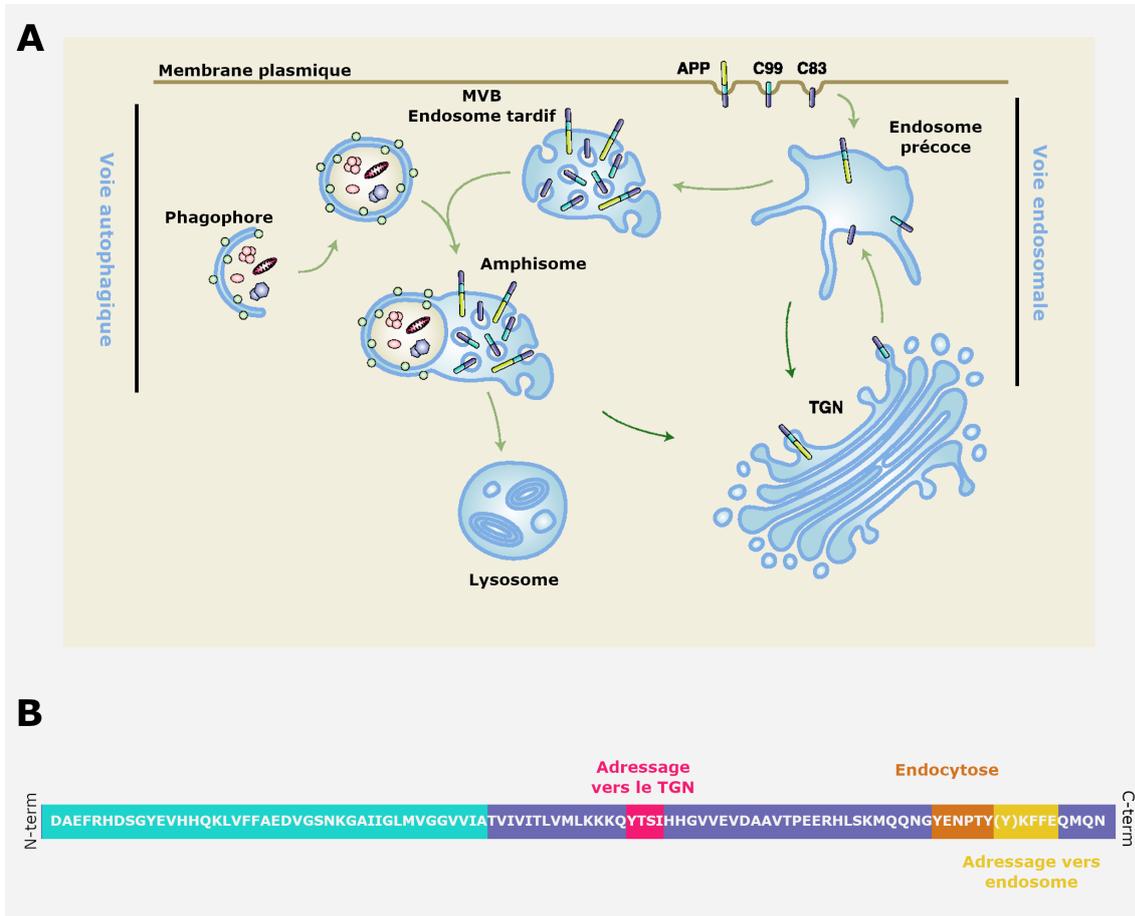


Figure 4.2.: Convergence de la voie endosomale et de la voie autophagique

(A) Dans la cellule, la voie endosomale et autophagique agissent en harmonie pour dégrader les protéines toxiques, accumulées ou les organelles altérées. Le lysosome est l'acteur commun à ces deux voies et constitue l'étape finale nécessaire à la dégradation. (B) Séquence correspondant au C99 humain. Est indiquée en vert la séquence de l'A β et en rose, orange et jaune au niveau de la partie C-terminale les séquences participant au triage intracellulaire du C99 (Source : GONZÁLEZ et al., 2017)

Les hydrolases lysosomales Cette dégradation est réalisée par des enzymes appelées hydrolases, contenues dans la lumière du lysosome et dont l'activité est optimale à pH acide (entre 4 et 5). Il existe à ce jour une soixantaine d'hydrolases lysosomales différentes et les plus abondantes sont les cathepsines (**Cat**), qui sont importantes pour la dégradation des protéines grâce à leur activité protéolytique (protéases). Cette famille d'enzymes est divisée en plusieurs sous-familles nommées en fonction de l'acide aminé du site actif : (1) les cathepsines à cystéine comprenant la Cat B et la Cat L, (2) les cathepsines à aspartate comprenant la Cat D et (3) les cathepsines à sérine comprenant la Cat A. Ces différentes protéases se différencient donc par leur structure, leur mécanisme catalytique et leurs substrats. De plus, la majorité des cathepsines sont inefficaces à pH neutre, bien que certaines, comme la cathepsine D, semblent être actives dans le cytoplasme ou en extracellulaire (BEDNARSKI et LYNCH, 1996 ; TURK et al., 2000). Il a également été montré que la cathepsine D est l'enzyme majoritairement impliquée dans la clairance de l'A β chez le rat et chez l'Homme (McDERMOTT et GIBSON, 1997 ; NIXON, 2017). Au final, les produits de dégradation sont ensuite relargués dans le cytosol grâce à des perméases et servent ensuite pour générer de l'énergie ou de nouveaux composants cellulaires. Il est important de noter que la cathepsine D, étant une aspartyl protéase, elle fait donc partie de la même famille que les enzymes portant l'activité de la β -sécrétase, les homologues BACE. En effet, beaucoup d'inhibiteurs de BACE1, qui ont été testés en essais cliniques touchaient aussi l'activité de la cathepsine. À l'heure actuelle, les seules molécules encore en liste sont d'ailleurs celles qui, outre leur bonne spécificité pour BACE1, ne possèdent qu'une faible affinité pour la cathepsine D. Ce point sera discuté dans la discussion (voir [11.2 Inhibiteurs de la \$\beta\$ -sécrétase](#)).

La membrane lysosomale La fonction des lysosomes nécessite un maintien de l'acidité luminale entre 4 et 5. Cette acidification finement régulée est possible grâce à la présence de pompes à proton vacuolaires dépendantes de l'ATP (**vATPases**), localisées dans la membrane des lysosomes. Cette pompe utilise l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP en ADP pour transporter des protons dans la lumière vésiculaire. Pour résister à cette acidité et à l'action des enzymes, la membrane du lysosome est composée de protéines fortement glycosylées formant un manteau protecteur, le glycocalyx. Parmi elles, les protéines LAMP — pour "Lysosomal Associated Membrane Proteins" — LAMP1 et LAMP2, constituent à elles deux la moitié des protéines membranaires du lysosome et sont donc des marqueurs des lysosomes

matures (ESKELINEN, 2006). Cette membrane contient également des transporteurs, des canaux ioniques et des protéines du complexe SNARE, ces dernières étant nécessaires à la fusion du lysosome avec les vésicules à dégrader (LUZIO et al., 2007).

Localisation neuronale Les neurones sont des cellules asymétriques constituées d'un corps cellulaire (soma) et de prolongements (axones et dendrites). Les lysosomes sont concentrés dans les compartiments somato-dendritiques, et plus particulièrement dans la région périnucléaire.

Les revues suivantes ont également servi à la rédaction de cette partie : SETTEMBRE et BALLABIO, 2014 ; H. XU et REN, 2015 ; LAWRENCE et ZONCU, 2019.

4.2.2 Voie endosomale-lysosomale ou hétérophagie

Comme évoqué précédemment, les endosomes ont un rôle central dans la production du C99 et de l'A β , étant d'une part un point de rencontre entre l'APP et les sécrétases de la voie amyloïdogénique et d'autre part, doté d'un environnement favorable à l'activité de ces sécrétases (voir 2.3 Le trafic intracellulaire). Cependant, ces organites sont aussi impliqués dans le tri et le transport de ces protéines, conduisant à leur clairance. La voie endosomale — lysosomale peut être décrites suivant les différentes étapes subies par le substrat : son endocytose, son tri dans les endosomes précoces, son recyclage ou sa dégradation nécessitant son transport dans les corps multivésiculaires puis les endosomes tardifs, qui conduisent le substrat à dégrader vers les lysosomes.

Endocytose Ce mécanisme conduit à l'internalisation de matériel d'origine extracellulaire (comme A β) ou membranaire (comme APP ou C99). Pour les substrats extracellulaires, l'internalisation se fait grâce à l'interaction avec des récepteurs membranaires alors qu'elle nécessite la présence d'une séquence consensus d'internalisation pour les composants membranaires. Dans le cas de l'APP, cette séquence « YENPTY » est située en C-terminale de la protéine (résidus 682-687 de l'APP 695) (voir Figure 4.2). De plus, l'internalisation de l'APP est induite par une perte d'interaction de cette protéine avec des protéines adaptatrices, comme Fe65, qui servent à stabiliser la protéine à la membrane plasmique. Plusieurs types d'endocytose ont

été décrits : celle impliquée dans l'internalisation de l'APP est la voie classique dépendante des clathrines. L'invagination de la membrane plasmique va conduire à la formation d'une vésicule endocytaire, qui va ensuite rejoindre les vésicules associées au compartiment endosomal, comprenant les endosomes précoces, les corps multivésiculaires (MVB) — pour "MultiVesicular Bodies" —, les endosomes tardifs et les endosomes de recyclage (voir Figure 4.2). Ces différents types d'endosomes se distinguent par leur morphologie, leur pH et par l'expression de marqueurs spécifiques, notamment les petites GTPases, Rab¹ — pour "Ras-associated binding" —. Ces Rab (environ 70 membres) sont impliquées dans le transport et la fusion de ces vésicules, mais leur mécanisme exact ne sera pas décrit dans ce manuscrit. Le majeur régulateur de l'endocytose est Rab5, qui est donc un marqueur des endosomes précoces.

Endosomes précoces Après internalisation, le substrat se retrouve dans les endosomes dit précoces, localisés préférentiellement dans la portion axonale du neurone, proche de la membrane plasmique. Ce petites vésicules (100 à 500nm, en fonction du type cellulaire) se caractérisent par un pH légèrement acide (≈ 6.3) et par l'expression des marqueurs **Rab5** et **EEA1** — pour "Early Endosome Antigen" —, ce dernier étant un effecteur de Rab5 et un antigène spécifique de ce compartiment. Le substrat peut ensuite rejoindre deux voies distinctes : (1) soit être recyclé à la membrane plasmique ou à l'appareil de Golgi *via* les endosomes de recyclage, (2) soit être dirigé vers les lysosomes *via* les MVB puis les endosomes tardifs.

Endosomes de recyclage Le recyclage vers la membrane plasmique peut s'effectuer suivant deux mécanismes : un recyclage direct et rapide médié par **Rab 4** ou un recyclage plus lent *via* les endosomes de recyclage. Ces endosomes sont localisés majoritairement dans le soma et au niveau des épines dendritiques et se caractérisent par l'expression des marqueurs **Rab11** et **Rab8**. Un recyclage vers le TGN peut également avoir lieu à partir des endosomes précoces. Ce transport implique le complexe membranaire endosomale appelé rétromère et est appelé transport rétrograde. Ce complexe contient les protéines VPS — pour "Vacuolar Protein Sorting" — dont le VPS25 et les protéines Snx — pour "Sortin Nexin" —. En condition normale, le rétromère permet notamment le recyclage de l'APP et de BACE1 (β -sécrétase) vers l'appareil de Golgi, impliquant la protéine SORLA (voir 2.3.2 Importance de

1. les protéines Rab appartiennent à la super-famille des petites protéines G appelée Ras

la protéine SORLA) et empêchant le clivage amyloïdogène (Q.-Y. ZHANG et al., 2016). Initialement décrit comme étant impliqué dans le transport rétrograde, le complexe rétromère a aussi été montré récemment comme intervenant aussi dans le recyclage à la membrane plasmique. Enfin, le recyclage du substrat peut également se produire à partir des MVB ou des endosomes tardifs.

MVB et endosomes tardifs Les corps multivésiculaires sont de grosses structures vésiculaires (≈ 500 nm) contenant elles-mêmes un nombre variable de petites vésicules (50 à 150 nm), appelées vésicules intraluminales (ILVs) — pour "Intra-Vesicular Vesicles" —. Ces petites vésicules sont formées suite à l'invagination de la membrane des MVBs, qui semble être dépendante de la machinerie ESCRT — pour "Endosomal Sorting Complexes Required for Transport" —. Ces ILV fournissent notamment une partie des hydrolases au MVB puis à l'endosome tardif. En effet, la maturation des MVB conduit à la formation des endosomes tardifs, riche en ILV. Ces deux vésicules endosomales vont être transportées vers le corps cellulaire grâce aux microtubules, afin de rejoindre les lysosomes. Il y a acidification de ces vésicules au fur et à mesure qu'elles se rapprochent du soma, grâce à l'acquisition d'hydrolases acides et de pompes vATPases en provenance de l'appareil de Golgi. Les endosomes tardifs se caractérisent par un pH inférieur à 6 et l'expression des marqueurs **Rab7** et **Rab9**. Il est difficile de distinguer les endosomes tardifs et les lysosomes en microscopie habituelle, car ils expriment les mêmes marqueurs (Rab7, LAMP1 etc...). Cependant, la concentration des hydrolases notamment en cathepsines est beaucoup plus élevée dans les lysosomes.

Comme il sera décrit dans la partie 7.1 La biogenèse des exosomes, les MVBs sont aussi le lieu de formation des exosomes, qui sont les ILVs une fois sécrétées par les cellules, après fusion des MVBs avec la membrane plasmique. Les mécanismes impliqués dans la production des ILVs destinées à la dégradation lysosomale ou à la sécrétion exosomales semblent différents. À priori, les ILVs destinées à la dégradation lysosomale seraient formées par un mécanisme impliquant la machinerie ESCRT alors que celles destinées à la sécrétion seraient formées par un mécanisme dépendant des tétraspanines et/ou des céramides. Ceci donne naissance à différentes populations de MVBs.

En conclusion, la voie endosomale-lysosomale permet donc en condition normale la dégradation de l'APP situé à la membrane plasmique, de l'A β extracellulaire internalisé par endocytose ou du C99 produit dans les endosomes (voir Figure 4.2).

Les revues suivantes ont également servi à la rédaction de cette partie : ELKIN et al., 2016 ; NASLAVSKY et CAPLAN, 2018.

4.2.3 Voie lysosomale-autophagique ou autophagie

Le deuxième voie de dégradation faisant intervenir les lysosomes est l'autophagie, signifiant « se manger soi-même ». Ce mécanisme permet la dégradation des protéines intracellulaires à longue durée de vie, des complexes protéiques et des organites. Les premiers gènes de l'autophagie ont été identifiés chez la levure par le Dr Tsukada et le Dr Ohsumi en 1993 puis dans les cellules de mammifères en 1998 par le Dr Mizushima (TSUKADA et OHSUMI, 1993 ; MIZUSHIMA et al., 1998). Tout comme pour les lysosomes, cette découverte a valu au Dr Ohsumi le prix Nobel de médecine en 2016, montrant l'importance de ce processus pour la cellule. À ce jour, 41 gènes Atg — pour "Autophagy related Genes" — ont été identifiés et ont permis de disséquer d'un point de vue moléculaire ce mécanisme complexe, faisant intervenir plus de 1000 protéines. Différentes expériences de délétions des gènes Atg ont permis de mettre en évidence le rôle essentiel de l'autophagie dans l'homéostasie cellulaire. Classiquement, trois formes d'autophagie sont décrites, définies en fonction du mécanisme de prise en charge du substrat : (1) la microautophagie, dans laquelle le matériel à dégrader est directement incorporé par le lysosome, (2) l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA), qui nécessite la reconnaissance spécifique du substrat par une protéine chaperonne, Hsc70, et sa fixation sur le récepteur LAMP-2A et (3) la macroautophagie, qui implique l'encapsulation du matériel dans une vésicule appelée autophagosome (voir Figure 4.3). La macroautophagie est la voie autophagique majoritaire et la plus étudiée. C'est également celle impliquée plus spécifiquement dans la dégradation des protéines agrégées, appelée dans ce cas agrégaphagie.

La macroautophagie est extrêmement conservée au cours de l'évolution (levures, insectes, mammifères, végétaux, vers, zebrafish). Elle est maintenue à un niveau basale en condition normale – constitutivement active – et peut aussi être induite en conditions de stress pour assurer l'élimination notamment de métabolites toxiques ou de protéines anormalement agrégées (MIZUSHIMA et KOMATSU, 2011). Bien qu'induite dans tous les types cellulaires, la sensibilité aux différents inducteurs diffère en fonction de chaque type, les neurones étant quasiment insensibles au

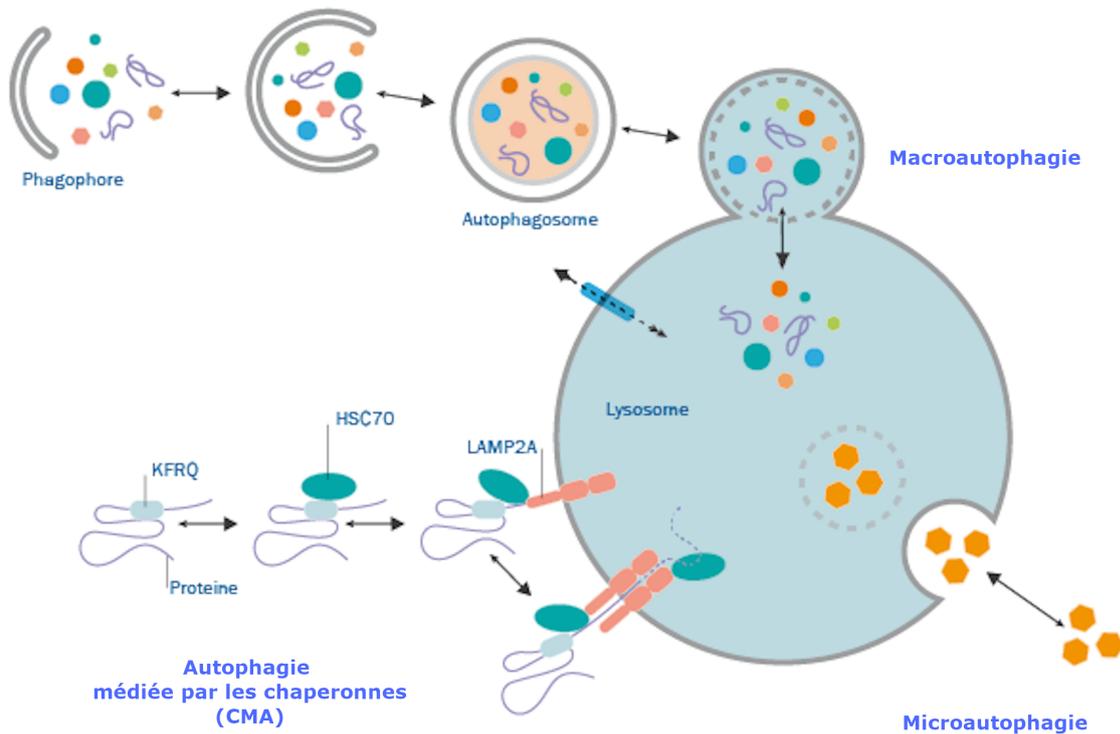


Figure 4.3.: Différents types d'autophagie

Schéma représentant les différents types d'autophagie convergeant vers le lysosome. (A) La microautophagie implique l'incorporation directe du matériel à dégrader par le lysosome, grâce à une invagination locale de sa membrane. Une fois à l'intérieur du lysosome, le matériel est dégradé par les hydrolases acides. Il n'y a que peu d'informations concernant implication de cette voie dans la MA. (B) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes (CMA) nécessite la présence sur la protéine à dégrader d'un motif spécifique « KFERQ », qui sera reconnu par la protéine chaperonne Hsc70. Cette chaperonne permet l'adressage du substrat vers les lysosomes, où elle est reconnue par la protéine membranaire LAMP2a. L'homodimérisation de LAMP2a facilite ensuite la translocation du substrat à travers la membrane lysosomale aboutissant à sa dégradation par les hydrolases. Bien que cette voie concerne principalement les protéines solubles cytoplasmiques et nucléaires, l'APP possède également une séquence ressemblant au motif consensus, « KFFEQ », qui pourrait permettre sa dégradation par le CMA. De plus, il a été montré que l'APP n'est en réalité pas dégradé par cette voie.. Cependant, cette voie ne permet pas de dégrader les protéines agrégées en raison de sa reconnaissance spécifique mais elle semble altérée aussi dans la MA. (C) La macroautophagie implique la formation d'une vésicule à double membrane, appelée autophagosome, qui va encapsider le matériel à dégrader puis fusionner avec le lysosome pour former l'autolysosome (Source : (Novus Biologicals))

stress lié à une privation en nutriments (NIXON et D.-S. YANG, 2012). La macroautophagie se caractérise souvent par un paramètre appelé flux autophagique, qui correspond à la résultante entre le taux de formation et le taux de dégradation des autophagosomes, vésicules à double membrane séquestrant le matériel à éliminer. N'ayant pas la possibilité de diluer le matériel potentiellement toxique, les neurones sont très vulnérables à une diminution du flux autophagique. Les mécanismes cellulaires et moléculaires de la macroautophagie sont aujourd'hui bien connus et peuvent être décrits suivant 4 étapes principales : l'initiation du phagophore, la formation de l'autophagosome, sa maturation et sa fusion avec le lysosome. Les mécanismes moléculaires exacts ne seront pas décrits mais impliquent principalement les protéines Atg (voir [Figure 4.4](#)).

L'initiation Les voies de signalisation responsables du déclenchement de l'autophagie sont nombreuses et souvent interconnectées. La voie centrale est celle impliquant la cible de la rapamycine chez les mammifères, mTOR, une inhibition de la voie mTOR étant activatrice de l'autophagie. D'un point de vue transcriptionnel, l'acteur principal dans l'induction de l'autophagie est le facteur de transcription EB (TFEB), dont je reparlerai plus tard dans le manuscrit (voir [5.4 Le facteur de transcription EB \(TFEB\)](#)). Il existe également des voies inductrices de l'autophagie indépendante de mTOR, impliquant par exemple l'AMPK — pour "AMP-activated Protein Kinase" —. Quelque soit la voie initiatrice, l'induction permet la mise en place d'une membrane d'isolement, appelée phagophore, qui va *in fine* séquestrer le matériel à dégrader. L'origine lipidique de ce phagophore est encore mal connue, probablement un mélange de plusieurs compartiments (membrane plasmique, réticulum endoplasmique, appareil de Golgi) et le recrutement de ces lipides est orchestré en partie par la protéine Atg9 (voir [Figure 4.4](#)).

Formation de l'autophagosome Le phagophore, qui est une double membrane, va ensuite s'allonger puis se refermer sur lui même pour former un vésicule, appelée autophagosome, de 0,5 à 1,5 μm de diamètre dans les cellules de mammifères. L'élongation du phagophore et la formation de l'autophagosome repose essentiellement sur 3 événements principaux : (1) le recrutement du complexe PI3K — pour "phosphatidylinositol 3-kinase" — contenant Bécline 1 et VPS34², (2) le recrutement du

2. cette protéine est l'unité catalytique de la PI3K de classe III

complexe Atg12-Atg5-Atg16 et (3) la conjugaison du LC3I sur la phosphatidyléthanoline (PE) située sur la membrane pré-autophagosomale, formant ainsi le LC3II — pour "microtubule-associated protein Light Chain 3" —. La PI3K va produire à partir du PI du PI3P, qui est fortement enrichi à la membrane des autophagosomes et qui sert de molécule d'échaffaudage pour le recrutement des protéines Atg. Les substrats autophagiques peuvent être choisis sélectivement, grâce à un marquage ubiquitine. Dans ce cas, une protéine réceptrice (p62, optineurine...) peut se lier de manière non-covalente aux protéines préalablement ubiquitinylées et servir de cargo pour amener le substrat jusqu'au phagophore. À ce niveau, la protéine réceptrice (grâce à la région LIR — pour "LC3-Interacting Region" —) va se lier au LC3II permettant de séquestrer le substrat à l'intérieur de la vésicule. Une fois l'autophagosome formé, l'ensemble des protéines Atg est recyclé, excepté le LC3II qui reste incorporé dans la membrane interne et constitue donc un marqueur des autophagosomes (voir Figure 4.4). Dans le neurone, la formation de ces vésicules a été observée au niveau du corps cellulaire mais également à la terminaison axonale.

Remarque 13 : Cas des APP-CTFs

L'équipe du Dr Greengard a montré le complexe AP2-PICALM sert de cargo pour la reconnaissance et l'expédition des APP-CTFs du système endosomal vers la voie autophagique. En effet, AP2 est capable d'interagir (1) avec les APP-CTFs permettant son adressage vers le phagophore et (2) également avec LC3II : il servirait donc de linker comme p62. PICALM est un partenaire d'interaction de AP2 nécessaire à ce mécanisme et également un facteur de risque dans la MA (TIAN et al., 2013).

Maturation de l'autophagosome Elle s'effectue par une ou plusieurs étapes de fusion de l'autophagosome avec les vésicules du système endosomal (endosomes précoces, MVB et endosomes tardifs), conduisant à une vésicule appelée amphisome. L'efficacité de fusion semble identique entre les différents types d'endosomes (MORVAN et al., 2009). Au cours de cette maturation, l'autophagosome acquiert des pompes vATPase ainsi que des hydrolases acides, permettant de diminuer le pH de ces vésicules initialement égal à celui du cytosol. Il est encore controversée si la formation de l'amphisome est indispensable ou pas pour la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes. Les autophagosomes localisés au niveau des axones vont également subir, au cours de cette maturation, un transport rétrograde le long des microtubules, orchestré par les moteurs protéiques, en direction du soma où sont concentrés les lysosomes. L'analyse sur cellules vivantes de ce transport a révélé deux modes de fusion autophagosomale : soit une fusion complète conduisant à une nouvelle vésicule, soit une fusion dite « *kiss and run* », qui est une fusion

partielle permettant à l'autophagosome de déverser son contenu dans une autre vésicule (FASS et al., 2006 ; JAHREISS et al., 2008).

Formation de l'autolysosome et dégradation L'étape ultime dans la maturation des autophagosomes est la fusion avec les lysosomes, permettant le relargage des substrats à dégrader dans la lumière du lysosome et donc leur dégradation par les hydrolases. Cette fusion conduit à la formation d'une vésicule uni-membranaire, appelée autolysosome, la membrane interne de l'autophagosome étant dégradée par les hydrolases du lysosome. La machinerie nécessaire à cette fusion implique entre autres la protéine SNARE, syntaxine 17 du côté autophagosomal et la protéine Rab7 et les protéines LAMP1 et LAMP2 du côté lysosomal. Au niveau biochimique, l'autolysosome se distingue de l'autophagosome par l'expression de marqueurs lysosomaux (LAMPs, cathepsines).

Les revues suivantes ont également servi à la rédaction de cette partie : FRIEDMAN et al., 2015 ; NIXON et D.-S. YANG, 2012 ; UDDIN et al., 2018 ; BOLAND et al., 2018

Les voies endosomales et autophagiques sont étroitement liées et permettent le maintien de l'homéostasie protéostatique. De nombreuses études *in vitro* ont confirmé la dégradation du C99, comme de l'APP, des autres APP-CTFs ou de l'A β , par la voie endosomale-lysosomale-autophagique (VINGTDEUX et al., 2007 ; BOLAND et al., 2010 ; TIAN et al., 2011 ; M. ASAI et al., 2011 ; H. WANG et al., 2015). Cette voie est très complexe et fait intervenir de nombreux acteurs cellulaires et moléculaires. L'altération d'un de ces acteurs peut donc entraîner un dysfonctionnement de cette voie et être responsable de l'accumulation du C99 par exemple dans les neurones.

4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer

En condition normale, l'autophagie est induite en réponse à un stress cellulaire comme l'accumulation de protéines toxiques ou agrégées ou la privation en nutriments, permettant ainsi de maintenir l'équilibre protéostatique de la cellule.

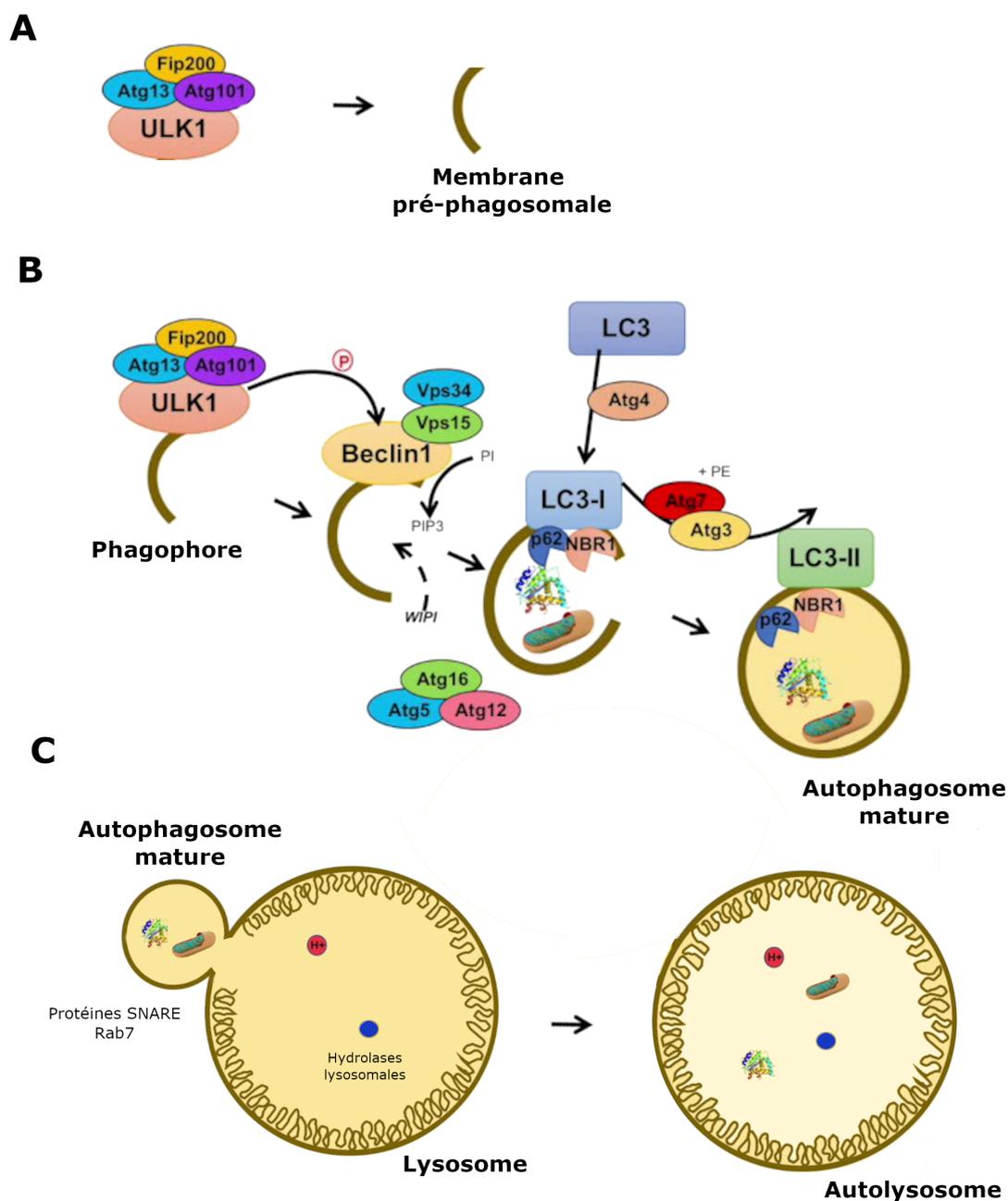


Figure 4.4.: Mécanisme de la macroautophagie : acteurs cellulaires et moléculaires

La macroautophagie s'effectue en 4 étapes principales : (A) l'induction, qui conduit à la formation d'une membrane pré-phagosomale ou phagophore (B) la formation et la maturation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome et (C) la formation de l'autolysosome, après fusion de l'autophagosome avec un lysosome. Le matériel de l'autophagosome est ensuite dégradé par les hydrolases lysosomales. (JJ Medecine)

Néanmoins, l'activité autophagique décline avec l'âge ou peut être altérée dans certaines pathologies, comme les cancers ou les maladies neurodégénératives, conduisant à une accumulation anormale de protéines. En effet, la plupart des maladies neurodégénératives se caractérisent par des dysfonctionnements du système endosomal-lysosomal-autophagique, participant à l'accumulation du C99 et de l'A β dans le cas de la maladie d'Alzheimer. Ces dysfonctionnements sont observés à la fois chez l'Homme et dans les modèles animaux de la MA, et apparaissent à des stades très précoces. Ce lien entre maladies neurodégénératives et dysfonctionnement EAL provient en partie de la vulnérabilité particulière des neurones face à des défaut de clairance, en raison dans leur caractère post-mitotique et donc leur incapacité à diluer leur protéines toxiques par mitose.

4.3.1 Différentes phases

Comme la majorité des caractéristiques neuropathologiques associées à la maladie d'Alzheimer, la pathologie EAL se développe de façon progressive mais semble avoir un rôle différent en fonction du stade de la maladie. La majorité des études s'accordent pour dire qu'elle serait protectrice au début de la maladie puis délétère à des stades plus avancés. En effet, la pathologie EAL se manifeste tout d'abord par une activation accrue de la voie lysosomale, ayant pour but de dégrader les premières protéines toxiques accumulées. Ce dysfonctionnement se traduit par une activation des gènes et des protéines spécifiques à la biogenèse des lysosomes (LAMP, cathepsines..) conduisant à une augmentation du nombre de lysosomes et de leur capacité de dégradation. Dans les stades précoces, il y a également une augmentation de l'endocytose et une forte activation de l'autophagie, détectable par une augmentation de la formation des autophagosomes. L'activation conjointe des voies endosomale – lysosomale – autophagique semblent apparaître dans un premier temps comme un mécanisme compensatoire et protecteur, en réponse à l'accumulation anormale de C99 et d'A β . Au fur et à mesure du développement de la maladie, la pathologie EAL devient délétère suite à des défauts de maturation et de transport des endosomes, accompagnés de l'altération progressive de la fonction lysosomale et de la clairance des autophagosomes produits.

4.3.2 Altérations de la voie endosomale

Le dysfonctionnement endosomal est un des premiers phénotypes pathologiques observés dans la MA. Il est bien sûr à mettre en lien avec la découverte de plusieurs gènes de susceptibilité de la MA impliqués dans le fonctionnement endosomal-lysosomal (PICALM, SORL1, BIN1...) (voir [Figure 4.5](#) et [Table 13.1](#)). Les premiers à avoir observé des anomalies endosomales associées à la MA étaient le Dr Suzuki and le Dr Terry en 1967 (SUZUKI et TERRY, 1967). Cette pathologie endosomale se manifeste par l'altération de plusieurs acteurs de cette voie : les endosomes précoces et tardifs ou les rétromères. La mise en évidence des mécanismes à l'origine de ces dysfonctionnements est basée sur l'étude de patients Alzheimer ou atteints de trisomie 21, chez ces derniers les anomalies endosomales apparaissent dès l'enfance (voir [remarque 15 : Trisomie 21 : intérêt pour l'étude de la MA](#)).

Les endosomes L'équipe du Dr Nixon fut la première à décrire des anomalies endosomales chez les patients atteints de la MA ou de Trisomie 21 à la fin des années 1990. En effet, il a été observé très tôt dans le cerveau de ces patients une accumulation anormale d'endosomes de grande taille au niveau des neurones du néocortex (jusqu'à 32 fois la taille des endosomes normaux), que ce soit dans les cas familiaux ou sporadiques de la MA (voir [Figure 4.6](#)). De plus, ces anomalies morphologiques sont associées à une augmentation de l'expression des protéines endocytaires comme Rab 5, Rab 4 et Rab 7 et de la cathepsine D. La présence de cat D au niveau des endosomes précoces, difficilement observable dans les endosomes de cerveaux sains, suggère une altération du transport de cette protéine (A. M. CATALDO et al., 1997).

Bien plus tard, cette même équipe a montré que ces anomalies ne sont des caractéristiques du vieillissement normal ou une caractéristique commune aux maladies neurodégénératives, mais semblent spécifiques de la MA³ et liées à l'accumulation du C99 (Y. JIANG et al., 2010). En effet, ces effets seraient liés à une activation pathologique de la protéine Rab5, due à une plus grande quantité de C99 dans le cerveau des patients Alzheimer et indépendamment de l'A β . Le lien entre le C99 et la protéine Rab5 vient de leur interaction avec un partenaire commun, la protéine APPL1 — pour "Adaptor Protein, Phosphotyrosine Interacting With PH Domain And

3. des altérations similaires ont néanmoins été observées également chez les patients atteints de trisomie 21 ou de la maladie de Nieman-Pick, ces deux pathologies présentent de façon plus large de nombreuses similarités avec la MA au niveau des lésions

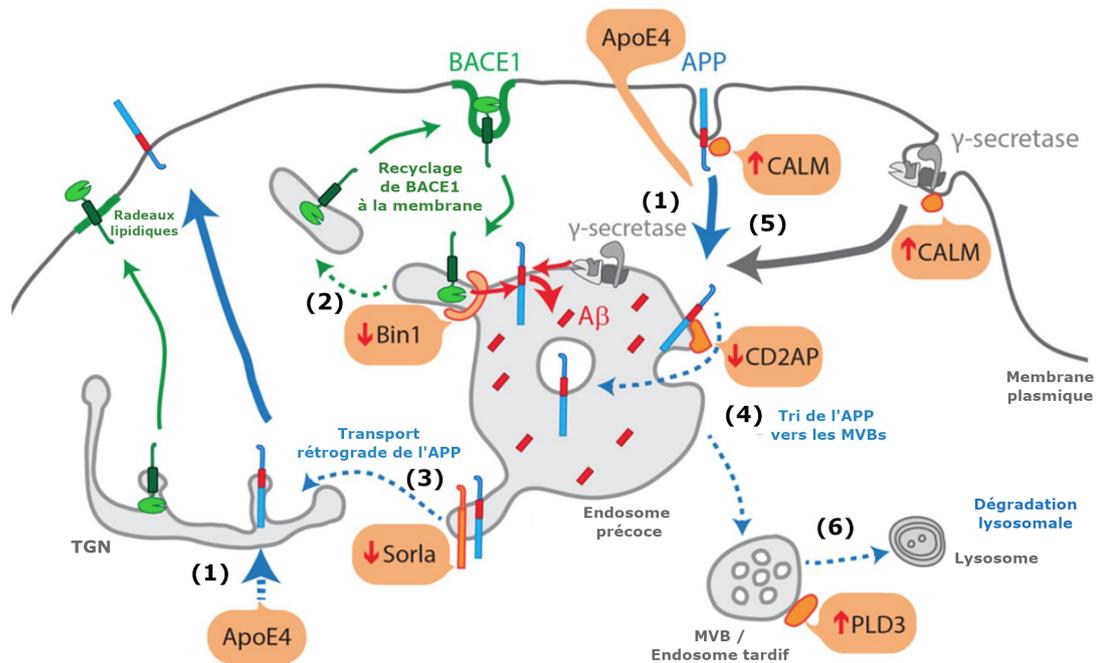


Figure 4.5.: Lien entre les gènes de prédisposition associés à la MA et les altérations endosomales

Schéma illustrant l'implication de plusieurs gènes à risque associés à la MA dans la voie endosomale-lysosomale empruntée par l'APP. (1) Le facteur APOE4 augmente l'endocytose de l'APP ainsi que la quantité d'APP dans la voie sécrétoire, en raison de l'augmentation de sa transcription. (2) La perte de fonction de BIN-1 altère le recyclage de BACE1 à la membrane, qui est retenu dans les endosomes. (3) La perte de fonction de SORLA diminue le transport rétrograde de l'APP vers le TGN, qui s'accumule dans les endosomes. (4) La perte de fonction de CD2AP diminue le tri de l'APP vers les MVBs et donc diminution sa dégradation (5) La perte de fonction de CALM augmente l'endocytose de l'APP et du complexe γ -sécrétase. (6) Enfin, la perte de fonction de PLD3 affecte la morphologie des lysosomes. Les flèches rouges indiquent les altérations (augmentation ou diminution) des mécanismes subcellulaires associés à chaque gène de prédisposition. L'ensemble de ces dérégulations entraîne une séquestration de l'APP et de ses sécrétases dans les compartiments endolysosomaux, favorisant ainsi la voie amyloïdogénique. (Sources : GUIMAS ALMEIDA et al., 2018)

Leucine Zipper 1" — qui est un effecteur de Rab5 (voir remarque 14 : Interaction C99 avec APPL1). Plus précisément, en s'accumulant à la membrane endosomale, le C99 permettrait le recrutement de la protéine APPL1 au niveau des endosomes, entraînant ainsi la stabilisation de Rab5 sous sa forme active (Rab5-GTP). Cette activation pathologique de Rab5 conduirait à une augmentation de l'endocytose et de la fusion des endosomes entre eux, conduisant à des endosomes élargis (S. KIM et al., 2016). Dans un deuxième temps, cet élargissement des endosomes provoquerait un défaut de leur transport ainsi qu'un défaut de maturation des endosomes tardifs. Ce dernier se traduit par une augmentation du nombre et de la taille des vésicules exprimant Rab7, spécifiquement observé dans le cortex frontal, l'hippocampe et le cerveau antérieur (GINSBERG et al., 2010; GINSBERG et al., 2011).

Remarque 14 : Interaction C99 avec APPL1

- se fait grâce à la séquence YENPTY présente sur C99 et le domaine PTB de l'APPL1
- préférentiellement avec C99 et pas les autres fragments d'APP. Ceci peut s'expliquer de par la localisation du C99, majoritairement dans les radeaux lipidiques grâce à son interaction également avec le cholestérol.

Cette cascade est amplifiée au fur et à mesure de la maladie puisque l'activation prolongée de Rab5 va également favoriser le clivage de l'APP en C99, créant une boucle pathologique (voir Figure 4.6). Enfin, l'activation de Rab5 entraînerait ainsi (1) un défaut d'acidification des lysosomes et de l'activité des protéases lysosomales, (2) des dysfonctionnements synaptique (LTP et LTD) et cognitif, (3) la dégénérescence des neurones cholinergiques (W. XU et al., 2016). Au contraire, la délétion d'un allèle de BACE1 (enzyme responsable du clivage de l'APP en C99) dans un modèle de souris de trisomie 21 permet de réduire les anomalies endosomales et également empêche la mort des neurones cholinergiques, due à une signalisation neurotrophique anormale (Y. JIANG et al., 2016). Une autre équipe propose que l'effet du C99 sur la pathologie endosomale précoce passerait par la capacité du C99 à se lier à la protéine TMEM30A, qui est un composant de la flippase lipidique, à l'origine de la translocation des phospholipides du feuillet externe vers le feuillet interne de la membrane (TAKASUGI et al., 2018).

Une étude publiée très récemment confirme ces altérations endosomales et le rôle du C99 dans des neurones humains dérivées de cellules souches pluripotentes induites (iPSC) portant des mutations FAD sur les gènes *APP* ou *PSEN1* (KI CRIPR/-Cas9) (KWART et al., 2019). Ces résultats sont très importants car ils mettent en avant l'implication du C99 dans le développement de ces anomalies, en l'absence

de surexpression. De plus, cet effet serait indépendant de l'A β ou du C83. Une deuxième étude, réalisée aussi sur des neurones humains dérivés d'iPSC, montre que les mutations sur PSEN1 (seulement 3 mutations testées) ne semblent pas affectées les endosomes précoces mais uniquement les endosomes tardifs et les lysosomes (HUNG et LIVESEY, 2018) alors que les mutations sur l'APP engendrent des défauts au niveau des 3 compartiments. Ce résultat semble est en accord avec les observations plus anciennes du Dr Cataldo, qui suggéraient que les mutations sur PSEN1 et PSEN2 n'affectent pas la taille des endosomes, contrairement aux mutations sur l'APP (A. M. CATALDO et al., 2000 ; A. CATALDO et al., 2001). Des résultats obtenus par mon équipe suggèrent également que, dans au moins deux modèles de souris (les souris 3xTg-AD et les souris AAV-C99) l'accumulation du C99 a lieu principalement au niveau des endosomes tardifs ainsi qu'au niveau des lysosomes et des autolysosomes (LAURITZEN et al., 2016). La différence entre ces observations peut être dépendante du modèle, caractérisé par un stade plus ou moins avancé de la pathologie endosomale. À nouveau, dans les études du Dr Kwart et Dr Hung réalisées sur des iPSCs humaines, l'utilisation d'inhibiteurs β -sécrétase (mais pas de γ -sécrétase) permet de réduire la pathologie endosomale.

Remarque 15 : Trisomie 21 : intérêt pour l'étude de la MA

La trisomie 21 se caractérise par la présence chez ces maladies de 3 chromosomes 21. Ce chromosome porte notamment l'APP, qui est une protéine clé dans la MA. L'APP est chez ces patients "surexprimée" mais non mutée, en comparaison avec les FAD. Ces patients trisomiques développent donc de façon très précoce la MA. L'étude de ces patients présente un intérêt particulier dans le contexte de la MA, et notamment pour l'étude des stades précoces. Les marqueurs retrouvés chez les patients atteints de trisomie 21 :

- présence d'A β ₄₂ dès le développement foetal (TELLER et al., 1996).
- présence de dépôts amyloïdes dès l'enfance.
- présence de l'accumulation de C99.
- présence des anomalies endosomales.
- présence de la pathologie Tau, ultérieure à la pathologie amyloïde.

Dans les cas sporadiques, les mécanismes à l'origine de ce dysfonctionnement sont moins clairs. Néanmoins, plusieurs études ont également montré une augmentation du C99 dans des cerveaux de patients Alzheimer (sAD) (S. KIM et al., 2016 ; PULINA et al., 2019 ; PERA et al., 2013), pouvant conduire à une dérégulation similaire. Il est possible que cette augmentation de C99 soit liée à certains gènes de susceptibilité associés à la MA et impliqués dans le transport vésiculaire et/ou la dégradation lysosomale (voir 1.3.3 **Prédispositions génétiques** et **Figure 4.5**). Par exemple, les travaux de l'équipe du Dr Nixon ont proposé un lien entre cette accumulation de C99 et la possession de l'APOE4 ou avec un régime riche en cholestérol. En effet, la

possession de l'APOE4 a été associée d'une part à une augmentation de l'endocytose d'APP ainsi qu'à une altération du recyclage endosomal et d'autre part à l'apparition précoce d'endosomes élargis à des stades pré-cliniques de la MA (A. M. CATALDO et al., 2000 ; NIXON, 2017).

Les rétromères Les altérations morphologique et fonctionnelle des endosomes décrites précédemment s'accompagnent également d'un défaut de triage par les rétromères, qui assurent en temps normal le transport rétrograde de l'APP et de ses sécrétases, des endosomes vers l'appareil de Golgi. En effet, l'expression de certains des composants du complexe est diminuée chez les patients Alzheimer (VPS35 et VPS26), contribuant ainsi la rétention et l'accumulation de l'APP ainsi que de ses métabolites (C99 et $A\beta$) dans les endosomes (SMALL et al., 2005). L'équipe du Dr Hallbeck a montré que l'altération de la fonction des rétromères, liée à une réduction de VPS35, entraîne une accumulation intracellulaire d' $A\beta$ oligomérique en provenance du milieu extérieur ou d'un autre neurone. Cette étude montre également que les oligomères d' $A\beta$ seuls peuvent induire une diminution de l'expression de VPS35. Au contraire, la surexpression de VPS35 dans des souris 3xTg-AD permet une restauration du phénotype (histologique, synaptique, cognitif, inflammatoire) (J.-G. LI et al., 2019). D'autre part, plusieurs gènes de susceptibilité de la MA codent pour des composants du rétromère comme Rab7A ou SNX3 (RAJENDRAN et ANNAERT, 2012) ou SORLA. Ce défaut de triage est aussi amplifié par une déficience, chez les patients Alzheimer, de Rab11, qui est une protéine essentielle pour le fonctionnement des endosomes de recyclage. L'altération du trafic des endosomes va également contribuer au défaut autophagique, puisqu'avant de fusionner avec les lysosomes, les endosomes tardifs peuvent également fusionner avec les autophagosomes.

4.3.3 Altérations de la voie autophagique

Les premières études sur le dysfonctionnement autophagique dans la MA ont débuté avec l'observation, par l'équipe du Dr Nixon, d'une accumulation de vésicules autophagiques immatures et non-dégradées dans les neurites dystrophiques présentes dans les cerveaux de patients atteints de forme sporadiques de la MA (NIXON et al., 2005). Cette accumulation anormale est également retrouvée chez les patients FAD et chez plusieurs modèles animaux de la MA, dans lesquels ce défaut apparaît avant

même la perte synaptique et neuronale. L'abondance des vésicules autophagiques dans les cerveaux Alzheimer est d'autant plus marquante que ces vésicules sont très difficiles à observer dans un cerveau normal.

L'accumulation anormale de vésicules autophagiques dans les neurones des patients ou des modèles Alzheimer constitue le premier signe de la pathologie autophagique. Néanmoins, cette présence accrue de vésicules autophagiques peut être la conséquence de deux altérations distinctes ou cumulées : soit une augmentation de la formation des autophagosomes, soit une diminution de leur dégradation (voir [Figure 4.6](#)). La littérature actuelle ne permet pas d'apporter une réponse claire à ce sujet, bien qu'un grand nombre d'études suggère qu'un défaut de fusion et/ou de protéolyse lysosomale serait avant tout à l'origine de la pathologie autophagique. De plus, les vésicules autophagiques accumulées dans le cerveau des modèles ou des patients Alzheimer présentent une morphologie similaire à celle observée après blocage de la protéolyse lysosomale causée par une délétion de cathepsines. En réalité, plusieurs étapes de la macroautophagie semblent être affectées au cours de la MA : l'initiation de la formation de l'autophagosome, leur transport, leur fusion et leur dégradation par les lysosomes mais la protéolyse lysosomale semble être la plus lourdement touchée.

Altération de l'initiation L'augmentation de l'initiation de la macroautophagie, comme explication à l'accumulation des autophagosomes dans la MA, reste aujourd'hui controversée. Certaines études montrent, en effet, que les gènes autophagiques sont augmentés dans le cerveau des patients Alzheimer et que l'A β pourrait, lui même, induire la formation des autophagosomes *via* l'activation de la voie AMPK (SON et al., 2012). Au contraire d'autres sont plutôt en faveur d'une répression de l'autophagie. Ces dernières s'appuient sur plusieurs arguments différents : (1) la présence dans différents modèles murins de la MA ainsi que chez les patients d'une hyperactivation de la voie mTOR, inhibitrice de l'autophagie, (2) une diminution précoce de l'expression et de l'activité de la protéine Bécline-1 chez les patients Alzheimer (PICKFORD et al., 2008), (3) et une diminution de l'expression de p62 dans un modèle murin de la MA (Y. DU et al., 2009). Des résultats contradictoires ont de la même façon été obtenus lors de l'étude de l'expression du facteur de transcription TFEB dans le contexte de la MA, qui est le principal régulateur transcriptionnel de l'autophagie. Ces études seront détaillées dans la section [5.4.2 Altérations du TFEB dans la maladie d'Alzheimer](#). Ces différences

proviennent probablement d'analyses réalisées à différents stades de la maladie et dans différentes aires cérébrales. Elles semblent néanmoins supporter l'idée que la pathologie autophagique est progressive, protectrice dans un premier temps puis délétère.

Cette notion a été confirmée par l'étude transcriptomique du Dr Bordi, visant à étudier le dysfonctionnement autophagique dans les neurones pyramidaux de l'hippocampe de patients Alzheimer, à des stades précoces et tardifs de la maladie. Dès le stade III sur l'échelle de Braak, les neurones présentent une augmentation de l'expression des facteurs de transcription activateurs de l'autophagie (TFE3 et TFEB) ainsi que celle de leur gènes cibles. Cette hyperactivation concerne des gènes impliqués dans l'induction de l'autophagie (AKT1, MAPK3), la formation de l'autophagosome (Atg5, Atg12, LC3), la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Rab7), la biogenèse et la protéolyse lysosomale (LAMP1, Cat D). Cependant, le flux autophagique dans ces neurones semble graduellement inhibé avec la progression de la maladie, comme le montre l'accumulation de p62 et de LC3II, l'augmentation de la taille et du nombre d'autolysosomes au stade V. Ces anomalies reflètent un défaut de clairance lysosomale prononcé, conduisant à l'accumulation de vacuoles autophagiques dans les neurites dystrophiques. À noter que dans cette étude, les niveaux géniques et protéiques de Bécline 1 restent inchangés en fonction des stades (BORDI et al., 2016).

Altération du transport et de la maturation des autophagosomes Les premières observations de Nixon montrant l'accumulation de vésicules autophagiques pointent le doigt sur la présence accrue d'autophagosomes immatures et d'autolysosomes, contenant du matériel non ou partiellement dégradé. La maturation des autophagosomes et leur dégradation nécessite leur transport vers le soma, où sont situés les lysosomes. Ce transport rétrograde semble également altéré, comme le montre l'accumulation d'amphisomes ainsi que de vésicules autophagiques au niveau de l'axone et dans les neurites dystrophiques. Une diminution des niveaux de dynéines et de kinésines⁴, les deux principaux moteurs du transport axonal, est également observée dans le cerveau des patients Alzheimer (M. MOREL et al., 2012). Enfin, ce défaut de transport est amplifié par la déstabilisation des microtubules induite par la hyperphosphorylation de Tau, autre caractéristique de la MA.

4. les kinésines sont dirigées vers le pôle positif des microtubules – transport antérograde – alors que les dynéines sont dirigées vers le pôle négatif – transport rétrograde –

Autophagie et sécrétion L'autophagie joue un rôle important dans la sécrétion de l'A β et du C99. Une altération du système autophagique entraîne donc des défauts dans la sécrétion.

4.3.4 Altération de la fusion et de la dégradation lysosomale

Bien qu'une cinquantaine de mutations sur les gènes lysosomaux ait été décrite comme étant responsable de maladies rares appelées maladies de surcharge lysosomales (LSD) — pour "Lysosomal Storage Disorder" —, aucune mutation n'a été associée à la MA. La pathologie EAL se caractérise, dans les stades précoces de la MA, par une forte activation de la biogenèse des lysosomes conduisant à un nombre accru de lysosomes et une augmentation des protéines lysosomales (LAMP-1, cat D) au niveau du cerveau et/ou dans le LCR. Ce mécanisme peut être considéré comme un mécanisme d'auto-défense de la cellule. Avec le temps, la fonction lysosomale est altérée, ce qui se révèle par un élargissement des lysosomes, l'accumulation de substrats endocytaires et autophagiques et la réduction de l'activité de la cat D notamment (voir Figure 4.6). L'origine de ce dysfonctionnement est encore très controversé mais un défaut d'acidification des lysosomes semble être une caractéristique commune.

Rôle des présénilines ? Les premières hypothèses cherchant à expliquer ce dysfonctionnement se sont intéressées à la sous-unité catalytique du complexe γ -sécrétase, PS1. En effet, outre son rôle dans le métabolisme de l'APP, la protéine PS1 a été proposée comme étant impliquée dans la maturation et l'adressage de la pompe à proton, vATPase, vers les lysosomes. Plus précisément, PS1 jouerait un rôle de chaperonne afin de stabiliser la sous-unité V0a1 du complexe vATPase et permettre sa glycosylation dans le RE. Cette modification post-transcriptionnelle serait ensuite nécessaire à son adressage vers les lysosomes. Par conséquent, une rétention de la vATPase dans le RE, induite par une perte de fonction des PS1, provoquerait une baisse de l'acidification des lysosomes, les rendant non-fonctionnels. Ce dysfonctionnement a en effet été observé dans des fibroblastes invalidés pour les présénilines. Par analogie, il avait donc été proposé que les mutations sur *PSEN1* caractéristiques des FAD pourraient entraîner une perte de la fonction de cette protéine en tant que chaperonne et donc induire les défauts lysosomaux (J.-H. LEE

et al., 2010). D'autres études montrent que l'acidification des lysosomes dans les cellules déficientes pour PS1 n'est pas altérée et suggèrent que le dysfonctionnement lysosomal observé dans ces cellules est causé par une dérégulation de l'homéostasie calcique, empêchant la fusion des lysosomes avec les autophagosomes (COEN et al., 2012; X. ZHANG et al., 2012). Toutefois, cette fusion ne semble pas être totalement altérée puisque la majorité des lysosomes observés dans les neurites dystrophiques sont en réalité des autolysosomes (NIXON et al., 2005). Enfin, une étude réconcilie ces deux hypothèses en montrant, toujours dans des cellules invalidées pour PS1, que la déficience de la vATPase contribue au dysfonctionnement lysosomal mais également à la dérégulation calcique (J.-H. LEE et al., 2015).

La protéine PS2, autre sous-unité du complexe γ -sécrétase dont certaines mutations sont responsables des FAD, pourrait également participer au dysfonctionnement lysosomal. En effet, son enrichissement spécifique dans les endosomes tardifs et les lysosomes provoquerait l'accumulation d'A β_{42} insoluble dans ces compartiments. L'accumulation de l'A β dans les lysosomes créerait des pores dans la membrane lysosomale et provoquerait la fuite du contenu lysosomal, pouvant expliquer la présence de cathepsines (Cat B, Cat D et Cat L) au niveau des plaques séniles et des neurites dystrophiques (HIRAKURA et al., 1999).

Rôle du C99? Bien que les mutations sur *PSEN1* ou *PSEN2* puissent expliquer le dysfonctionnement lysosomal pour une petite partie des cas, son origine serait en réalité multifactorielle dans la majorité des cas et le C99 semble à nouveau jouer un rôle important. En effet, plusieurs études ont montré que le C99 est capable de s'accumuler à la membrane des lysosomes, entraînant un changement morphologique des lysosomes et une perturbation de l'activité des hydrolases, dans différents modèles de la MA (murins et iPSC) (LAURITZEN et al., 2016; KAUR et al., 2017; Y. JIANG et al., 2019; HUNG et LIVESEY, 2018). Alors que le mécanisme à l'origine de ce dysfonctionnement induit par le C99 n'a pas été encore publié, une hypothèse exposée par l'équipe du Dr Nixon à travers un poster présenté à l'AD/PD a été émise. En effet, ils ont montré que le C99, en interagissant avec la sous-unité V0 de la pompe vATPase au niveau des lysosomes, empêche l'assemblage de la vATPase et donc l'acidification des lysosomes. De plus, la perméabilisation de la membrane lysosomale induite par le C99 pourrait également induire la libération d'enzymes lysosomales et de Ca²⁺ dans le cytosol, conduisant à la mort cellulaire (GUICCIARDI et al., 2004). Enfin, le dysfonctionnement lysosomal-autophagique

est révélé aussi par une augmentation des gouttelettes lipidiques ainsi que de la lipofuscine dans les vésicules autophagiques, observable notamment dans le modèle 3xTg-AD (LAURITZEN et al., 2016).

Rôle d'APOE4 ? Le variant APOE4 participerait également à cette perméabilisation lysosomale puisqu'il a été montré que la fusion des vésicules contenant l'APOE4 avec les lysosomes perturberait la stabilité membranaire (JI et al., 2006 ; MAHLEY et HUANG, 2006).

Les revues suivantes ont également servi à la rédaction de cette partie : ORR et ODDO, 2013 ; NIXON, 2017 ; COLACURCIO et al., 2018 ; LIU et L. LI, 2019.

Chez les patients Alzheimer, l'accumulation d'endosomes, d'autophagosomes et de lysosomes est une caractéristique précoce de la maladie. Ce dysfonctionnement EAL affecte la clairance du C99 (et de l'A β) mais aussi le métabolisme de l'APP. En effet, puisque ces vésicules contiennent toute la machinerie nécessaire à la voie amyloïdogénique, leur accumulation constitue autant de sites supplémentaires pour la production du C99, amplifiant ainsi la pathologie EAL. D'autre part, l'émergence du C99 comme acteur potentiel dans l'initiation de ce dysfonctionnement amène à une question importante : le C99 est-il une cause et/ou une conséquence du dysfonctionnement EAL ? Cette question n'a actuellement pas de réponse claire mais les résultats de l'équipe suggèrent que le C99 peut être à la fois la cause et la conséquence de ce dysfonctionnement, donc induire une boucle pathologique à l'origine d'autres phénotypes toxiques de la MA. Pour finir, les dysfonctionnements EAL ne semblent pas restreints aux neurones puisque les cellules gliales présentent aussi des altérations de ce système (diminution de Bécline-1 et VPS35 dans les microglies de patients Alzheimer, altération autophagique dans les astrocytes exprimant APOE4 ou TREM2).

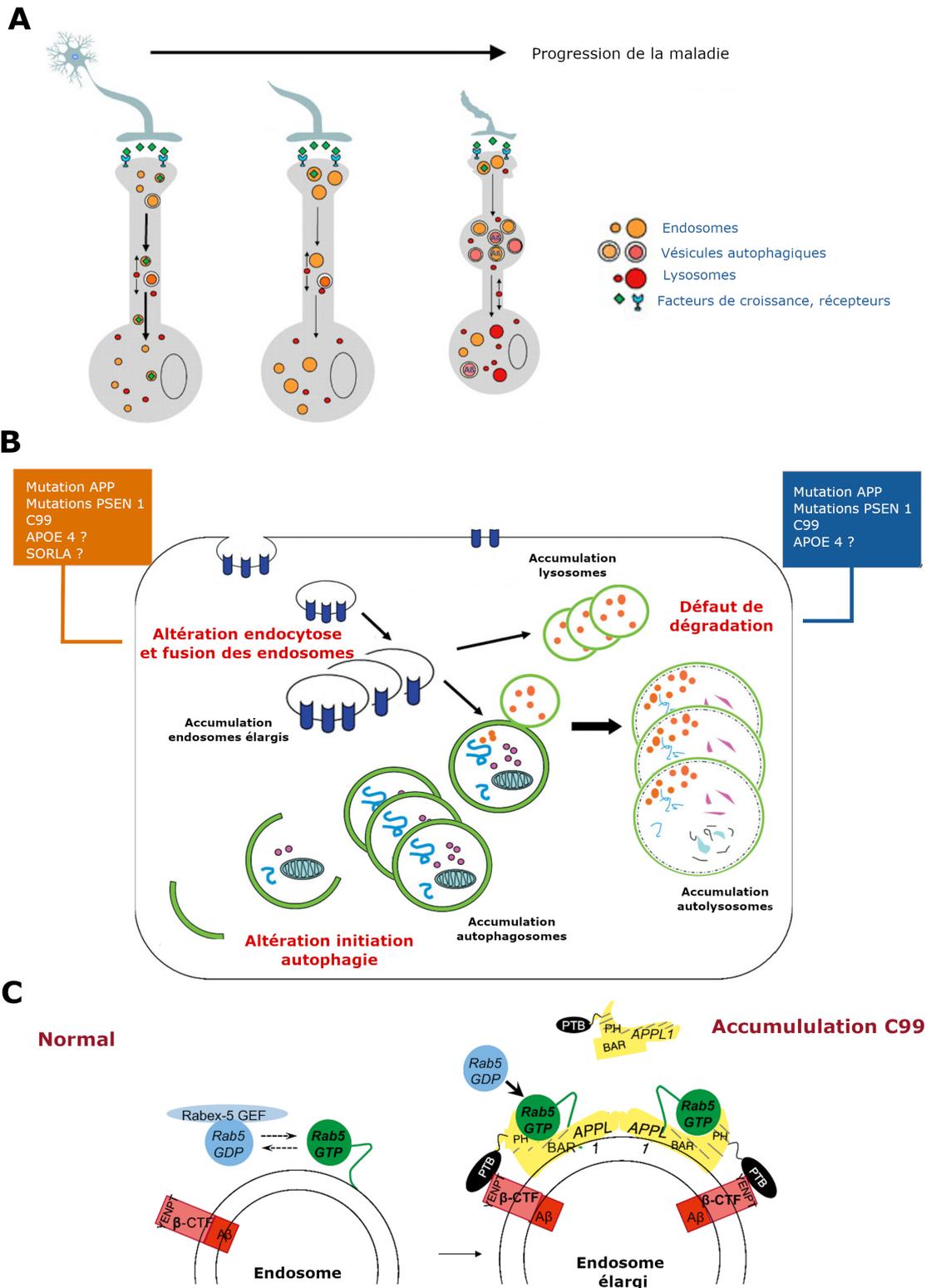


Figure 4.6.: Altérations endosomales-lysosomales-autophagique associées à la MA
 (A) Schéma représentant les altérations progressives du système EAL dans le neurone, au cours de la MA. (B) Lien entre les différentes causes de la MA (pour les formes familiales ou sporadiques) et les mécanismes EAL impactés (C) Mécanisme moléculaire décrivant le rôle du C99 dans l'activation pathologique de Rab5 et dans l'élargissement des endosomes précoces. (Sources : PIMPLIKAR et al., 2010 ; FUNDERBURK et al., 2010 ; Y. JIANG et al., 2010)

Modulation du système lysosomal-autophagique : quelles stratégies ?

Malgré leurs divergences sur un grand nombre de points, les experts de la maladie d'Alzheimer s'accordent pour dire que la stratégie à adopter pour soigner les malades est de réduire les protéines toxiques associées à la pathologie. Cette accumulation est causée, en partie, par un dysfonctionnement du système de dégradation endosomal-lysosomal-autophagique. Ainsi, une des stratégies thérapeutique envisageable pour soigner la MA serait de restaurer la fonction de la voie EAL. Cette approche est commune à un grand nombre de maladies neurodégénératives, définies comme des protéinopathies. Une myriade d'études, utilisant diverses approches ou molécules visant à restaurer cette voie de dégradation, ont été réalisées dans différents modèles de maladies neurodégénératives. Mon but dans cette partie n'est pas de répertorier l'ensemble de ces études mais de présenter quelques unes des stratégies testées dans des modèles cellulaires et animaux de la MA et ayant montré des effets bénéfiques sur différents phénotypes associés à la maladie. Plusieurs études sont basées sur une approche pharmacologique ou génétique utilisée dans le contexte de d'autres pathologies. Pour la majorité néanmoins, les mécanismes exacts à l'origine de leurs effets et leur spécificité ne sont pas clairement établis.

5.1 Cibler l'activité des lysosomes

Comme largement décrit auparavant, les lysosomes ont une activité diminuée dans la maladie d'Alzheimer. Ce problème de protéolyse lysosomale provient majoritairement d'un défaut d'acidification des lysosomes, empêchant l'activité des hydrolases.

Plusieurs études ont donc cherché à augmenter l'activité de ces hydrolases ou à rétablir un pH normal, dans différents modèles murins de la MA.

5.1.1 Activer les hydrolases

Une première stratégie a été d'activer les cathepsines, soit génétiquement, soit pharmacologiquement. Ces deux approches ont montré des effets bénéfiques dans plusieurs modèles de la MA. Dans une première étude, la cat B a été surexprimée chez des souris Alzheimer âgées (modèle J20) grâce à une approche virale. Cette surexpression entraîne une baisse du nombre de plaques amyloïdes dans le cerveau, montrant la pertinence de cette approche sur la clairance de plaques amyloïdes pré-existantes (MUELLER-STEINER et al., 2006). Ces données ont été confirmées dans un autre modèle par une étude plus récente, montrant à la fois une réduction des niveaux intracellulaires et extracellulaires d'A β mais également une amélioration de l'apprentissage et de la mémoire (EMBURY et al., 2017). D'autres équipes se sont basées sur une approche différente, consistant à invalider des inhibiteurs endogènes des cathepsines à cystéine dont la cat B ; ces inhibiteurs sont appelés cystatine B ou C. Cette activation indirecte de la cat B entraîne à nouveau un effet bénéfique sur les niveaux d'A β , sur la fonction synaptique et cognitive dans différents modèles FAD (B. SUN et al., 2008 ; D.-S. YANG et al., 2011 ; D.-S. YANG et al., 2014). De façon intéressante, cette approche conduit aux mêmes effets sur l'A β dans un modèle surexprimant l'APP humaine mais non mutée (C. WANG et al., 2012). Cependant, ces approches génétiques sont difficilement envisageables chez l'Homme et une approche pharmacologique basée sur la supplémentation en enzymes ne semble pas non plus appropriée, en raison de la non-perméabilité de la BHE, comme le montre les résultats obtenus dans un modèle de la maladie de Parkinson. Cependant, il faut aussi garder à l'esprit, que la BHE des patients Alzheimer serait altérée au fur et à mesure de la maladie, devant plus perméable. Des approches pharmacologiques utilisant des modulateurs lysosomaux ont donc été testées. Par exemple, une injection systémique du modulateur PADK — pour "Z-Phe-Ala-diazomethylketone" — chez deux modèles de la MA (souris APP^{swE}/ind et APP-PS1) augmente l'activité de la cat B dans le cerveau (jusqu'à 10 fois) et conduit à une diminution des taux d'A β à des stades avancés et une amélioration des fonctions cognitives (BAHR et al., 2012 ; BUTLER et al., 2011). Cette stratégie a été confirmée par une autre étude, visant à développer des modulateurs encore plus

efficaces (VISWANATHAN et al., 2012). Il semble d'ailleurs plus stratégique de cibler la cat B, plutôt que la cat D par exemple car son pH d'action est plus élevé que celui de la cat D et donc elle serait plus facilement activable dans les neurones où il y a un dysfonctionnement de la vATPase.

5.1.2 Restaurer le pH

Dans la maladie d'Alzheimer, un des défauts majeurs de la fonction lysosomale est l'alcalinisation de sa lumière. Une augmentation du niveau des enzymes en absence de correction du pH semble donc inutile. Une autre approche cherche donc à restaurer directement le pH lysosomal. Cette approche a été testée majoritairement dans des modèles murins de la maladie de Parkinson, ayant montré des effets bénéfiques, notamment avec l'utilisation de nanoparticules acidifiantes composées de poly (DL-lactide-co-glycolide) (PLGA) qui protègent les neurones dopaminergiques dans un modèle toxique de la maladie de Parkinson (BOURDENX et al., 2016). L'utilisation de cette stratégie chez l'Homme pose néanmoins des questions pratiques : comment injecter ces nanoparticules ? À quelle fréquence ? Cette stratégie utilisant les nanoparticules a également été utilisée par le groupe du Dr Nixon dans des cellules PS1 KO (J.-H. LEE et al., 2015) ou dans des modèles cellulaires de patients atteints de Trisomie 21 (Y. JIANG et al., 2019), permettant de restaurer dans ce dernier exemple les défauts lysosomaux induits par l'accumulation de C99. À ma connaissance, cette stratégie n'a pas encore été testée dans le contexte de la MA. D'autre part, plusieurs drogues ont également été démontrées comme entraînant l'acidification des lysosomes et l'amélioration des phénotypes toxiques dans des modèles *in vitro* et *in vivo* de la MA, mais ne sont pas spécifiques de cette voie. Par exemple, l'AMP cyclique et ses analogues (COFFEY et al., 2014 ; AGHSAMI et al., 2018) ou l'HP β CD (YAO et al., 2012) permettent l'amélioration des déficits d'apprentissage et de mémorisation dans des modèles de souris AD. La curcumine, qui est un polyphénol hydrophobe naturel actuellement testé en essai clinique sur des patients MCI, a également été montré comme augmentant l'acidification des lysosomes. Cependant, ce composé possède par ailleurs des propriétés de fixation à l'A β (testé comme colorant pour marquer les plaques), ce qui peut limiter son utilisation dans la MA.

5.2 Cibler l'autophagie

Comme pour les approches ciblant les lysosomes, un grand nombre d'études ciblant l'autophagie a été réalisée dans des modèles parkinsoniens. Dans le cas de la MA, la majorité des approches sont pharmacologiques et ont pour but de favoriser la première étape de la macroautophagie, c'est-à-dire l'induction et la formation des autophagosomes. Les inducteurs autophagiques peuvent être classés en deux groupes : ceux dépendant de la voie mTOR et ceux dont l'action est indépendante de la voie mTOR. Les drogues décrites dans cette partie sont principalement des molécules que j'ai testées dans mes travaux de thèse.

5.2.1 Inducteurs autophagiques dépendants de mTOR

Une des stratégies majeures pour favoriser l'autophagie est la répression du complexe mTORC1. La drogue la plus connue comme inactivant la voie mTOR est la rapamycine, qui est déjà utilisée comme antibiotique et immunosuppresseur pour empêcher les rejets lors de la transplantation d'organes. Les effets de cette drogue dans des modèles Alzheimer ont largement été décrits, comme dans le modèle 3xTg-AD où elle diminue la pathologie amyloïde et améliore les déficits cognitifs (CACCAMO et al., 2010). Les mêmes effets ont été confirmés lors de la délétion génétique de mTOR (CACCAMO et al., 2014). Cependant, ses effets ne sont observables que si le traitement est réalisé au début de la pathologie et sur le long terme (MAJUMDER et al., 2011). Des effets bénéfiques de l'inhibition de la voie mTOR ont été démontrés aussi dans des études utilisant une pro-drogue de la rapamycine (Temsirolimus). Celui-ci augmente la clairance d'A β et améliore l'apprentissage et la mémoire chez un modèle de souris Alzheimer (T. JIANG et al., 2014). Malgré les effets bénéfiques assez constants dans des modèles animaux et le fait que la rapamycine est généralement bien tolérée par l'humain (au moins par des patients ayant eu des greffes), aucune étude clinique a été envisagée à ce jour. Une petite molécule inductrice de la rapamycine (SMER28), mais indépendante la voie mTOR, a également montré un intérêt pour la réduction des niveaux d'APP-CTF et d'A β (TIAN et al., 2011). D'autres approches pharmacologiques recherchant à inhiber la voie de mTOR seront abordées dans la partie consacrée au TFEB, principal acteur de la voie mTOR (voir 5.4 Le facteur de transcription EB (TFEB)).

5.2.2 Inducteurs autophagiques indépendants de mTOR

Ces drogues sont principalement des activateurs directs ou indirects de la voie AMPK, autre voie activatrice principale de l'autophagie. Parmi ces composés, deux d'entre eux ont été testés en essai clinique : la metformine, utilisée comme anti-diabétique et le resveratrol, un activateur de la déacetylase et molécule anti-âge SIRT1. Malgré des résultats encourageants dans les études sur des modèles animaux, aucun de ces traitements n'a montré d'effets concluants sur les fonctions cognitives des patients Alzheimer (ROTERMUND et al., 2018). Enfin, le disaccharide naturel, trehalose a été également montré un effet bénéfique sur la clairance des agrégats amyloïdes et les performances cognitives dans un modèle de souris Alzheimer (J. DU et al., 2013).

5.2.3 Autres approches

D'autres études ont cherché à cibler différentes étapes de la macroautophagie, comme la formation des autophagosomes ou leur transport. La première stratégie consiste à activer la protéine Bécline 1, qui joue un rôle essentiel dans l'élongation du phagophore. Deux approches différentes ont été testées pour cibler cette protéine. Dans une première étude, l'administration de lentivirus exprimant Bécline-1 chez des souris Alzheimer, permet de réduire la pathologie amyloïde intracellulaire et extracellulaire (PICKFORD et al., 2008). La deuxième approche a été de réduire l'interaction de Bécline-1 avec son inhibiteur endogène Bcl2. En effet, les travaux du Dr Levine montrent que l'effet activateur de la Bécline-1 sur l'autophagie nécessite sa dissociation avec Bcl2. Ainsi, le Dr Rocchi a montré que l'expression endogène d'un mutant de Beclin, diminuant son interaction avec Bcl2, dans un modèle Alzheimer, permet de réduire l'accumulation d'A β et d'empêcher le déclin cognitif (ROCCHI et al., 2017). Des travaux en cours cherchent donc à identifier des molécules ayant la capacité de réduire cette interaction dans le but d'activer l'autophagie (CHIANG et al., 2018).

Une deuxième stratégie visant à favoriser l'autophagie consiste à rétablir le transport des vésicules autophagiques. La stabilisation des rétromères par des protéines chaperonnes a été donc été envisagée (MECOZZI et al., 2014; YOUNG et al., 2018) comme la stabilisation des microtubules. L'effet bénéfique de cette dernière sur le

déficit cognitif a été montré dans un modèle de souris Tau, par l'intermédiaire du composé épothilone D.

Enfin, le Dr Caccamo a cherché à cibler un autre acteur du mécanisme autophagique : la protéine p62. Grâce à une stratégie de thérapie génique, il a montré que l'augmentation de l'expression de p62 chez des souris APP/PS1, permet de réverser les défauts cognitifs (CACCAMO et al., 2017).

5.3 Combiner les approches ?

Étant donné que les dysfonctionnements observés dans la MA touchent plusieurs étapes du processus autophagique, la combinaison de plusieurs approches pourraient potentiellement permettre une meilleure restauration de la fonction lysosomale-autophagique.

Par exemple, il semble nécessaire de combiner dans le cas de la MA la supplémentation en hydrolases avec une approche réduisant le pH. En effet, la pathologie lysosomale dans cette maladie se caractérise en premier lieu par un défaut d'acidification, qui est nécessaire à l'activité des enzymes lysosomales.

D'autre part, la combinaison de deux inducteurs de l'autophagie, jouant sur des voies différentes, devraient augmenter les effets bénéfiques. Cette stratégie a été testée par le Dr Sarkar, qui a utilisé la rapamycine en combinaison avec des inducteurs indépendants de mTOR, montrant ainsi une meilleure clairance des protéines agrégées que les deux composés pris séparément (S. SARKAR et al., 2005 ; S. SARKAR et al., 2005). De plus, l'utilisation de deux drogues permet de réduire la dose de chaque traitement et permet potentiellement d'éviter les effets secondaires, s'il n'y a pas d'interaction entre les deux drogues évidemment.

Les revues suivantes ont également servi à la rédaction de cette partie : RENNA et al., 2010 ; FRIEDMAN et al., 2015 ; UDDIN et al., 2018 ; UDDIN et al., 2019 ; PENG et al., 2019.

En conclusion, les stratégies testées jusqu'ici pour moduler le système lysosomal-autophagique dans la maladie d'Alzheimer visent soit à restaurer la fonction lysosomale, soit à induire l'autophagie. Cependant une trop forte induction

de l'autophagie peut devenir pathologique dans le contexte de la MA car les lysosomes ne sont pas fonctionnels. Une meilleure stratégie serait donc de favoriser simultanément l'activité des lysosomes et l'induction de l'autophagie, permettant ainsi de cibler l'ensemble de la voie de dégradation. Cette approche est aujourd'hui envisageable grâce à la découverte du facteur de transcription EB (TFEB).

5.4 Le facteur de transcription EB (TFEB)

Rapidement après sa description en tant que régulateur principal des voies lysosomale et autophagique, le TFEB a connu un intérêt particulier, notamment dans le contexte des maladies neurodégénératives. En effet, à l'inverse des modulateurs lysosomaux ou des activateurs autophagiques, le TFEB active à la fois le système lysosomal et l'autophagie. Ainsi, ce facteur de transcription est apparu comme une nouvelle piste thérapeutique pour cette maladie. Cette stratégie est d'autant plus pertinente que ses propriétés sont altérées dans plusieurs maladies neurodégénératives dont la maladie d'Alzheimer. Avant d'aborder les connaissances actuelles concernant le rôle du TFEB dans la MA, il est important de comprendre sa fonction, ses mécanismes d'action ainsi que sa régulation.

5.4.1 Généralités

Fonction La fonction du TFEB a été mise en évidence par l'équipe du Dr Sardiello en 2009, suite à la découverte d'une séquence consensus située sur les promoteurs d'un grand nombre de gènes lysosomaux, la séquence CLEAR (GTCACGTGAC) — pour "Coordinated Lysosomal Expression and Regulation" — (SARDIELLO et al., 2009). Ce motif contient la séquence E-box qui est, de façon plus large, la cible d'une famille de facteurs de transcription (FT), appelée Hélice-Boucle-Hélice (hbx), d'après leur structure. Le TFEB appartient de plus à la sous-famille appelée MiT/TFE — pour "microphthalmia/transcription factor E" —, qui contient également les protéines MiT, TFE3 et TFEC. Ces facteurs de transcription ont une structure commune, constituée d'un domaine basique hbx de type « glissière à leucine », qui est important pour leur dimérisation et d'un domaine de liaison à l'ADN. La liaison spécifique du TFEB à la séquence CLEAR, présente en une ou plusieurs copies dans la région promotrice

de ces gènes cibles, permet leur activation transcriptionnelle. Une série d'analyses, basées sur les techniques de séquençage CHIP-Seq et d'induction transcriptionnelle du TFEB, a permis de mettre en évidence environ 400 cibles directes du TFEB. Ces gènes sont pour la majorité des composants du réseau CLEAR et sont impliqués d'une part dans la biogenèse et la fonction des lysosomes (formation, acidification, activité des hydrolases, exocytose, endocytose) et d'autre part dans différentes étapes de l'autophagie (initiation, élongation du phagophore, capture du substrat, transport et fusion) (voir [Figure 5.1](#)). **L'activation des gènes induits par le TFEB permet donc la clairance lysosomale et autophagique de protéines toxiques ou en fin de vie, mais aussi de mitochondries endommagées (mitophagie) ou de gouttelettes lipidiques (lipophagie).** En plus des gènes lysosomaux et autophagiques, certains gènes activés par le TFEB régulent le catabolisme cellulaire, la fonction mitochondriale ou la réponse au stress cellulaire.

Mécanisme En condition physiologique, le TFEB est localisé dans le cytosol grâce à son interaction avec la protéine appelée YWMA/14-3-3. Cette interaction est possible grâce à la phosphorylation au préalable du TFEB, notamment par le complexe mTORC1. Dans ce cas, le complexe mTORC1 est activé et transloqué à la surface des lysosomes suite à l'action de la GTPase Rag, permettant la phosphorylation du TFEB. L'interaction du TFEB avec mTORC1 à la surface des lysosomes, qui est dépendante de la partie N-terminale du TFEB, n'est donc qu'une étape transitoire mais importante pour la rétention du TFEB dans le cytosol. En condition de privation en nutriment ou de stress lysosomal, le TFEB est déphosphorylé et rapidement transloqué dans le noyau où il induit la transcription de ses gènes cibles, après fixation à la séquence promotrice CLEAR. Cette activation est induite, en partie, par l'inactivation de mTORC1 qui empêche la phosphorylation du TFEB (voir [Figure 5.2](#)).

Régulation L'activation du TFEB est majoritairement régulée par son niveau de phosphorylation, qui dépend de différentes kinases à sérine/thréonine et de phosphatases (PUERTOLLANO et al., 2018). Comme décrit précédemment, la phosphorylation maintient le TFEB dans le cytoplasme dans un état inactif et empêche sa translocation au noyau. La principale kinase impliquée dans la régulation du TFEB est mTORC1, qui va phosphoryler le TFEB sur différentes sérines : la Ser211, qui facilite son interaction avec la protéine 14-3-3, la Ser142, la Ser138 et la Ser122.

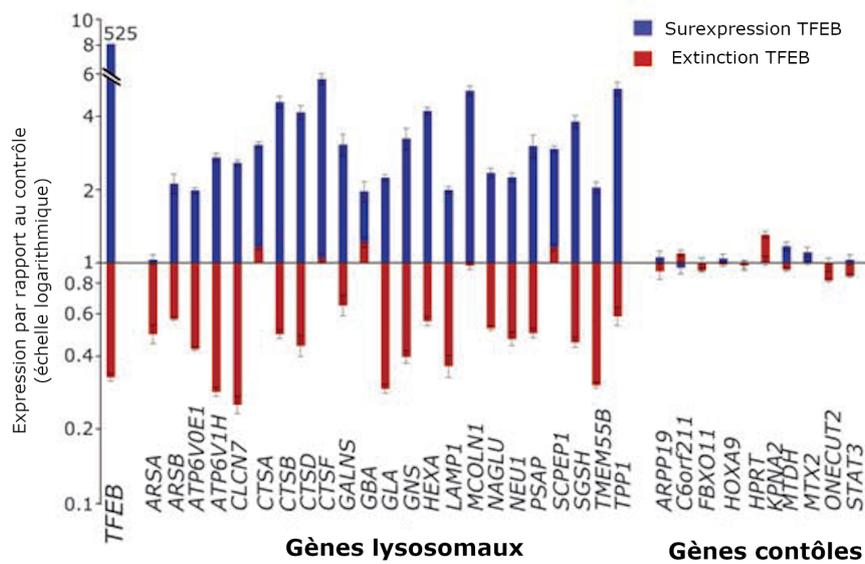
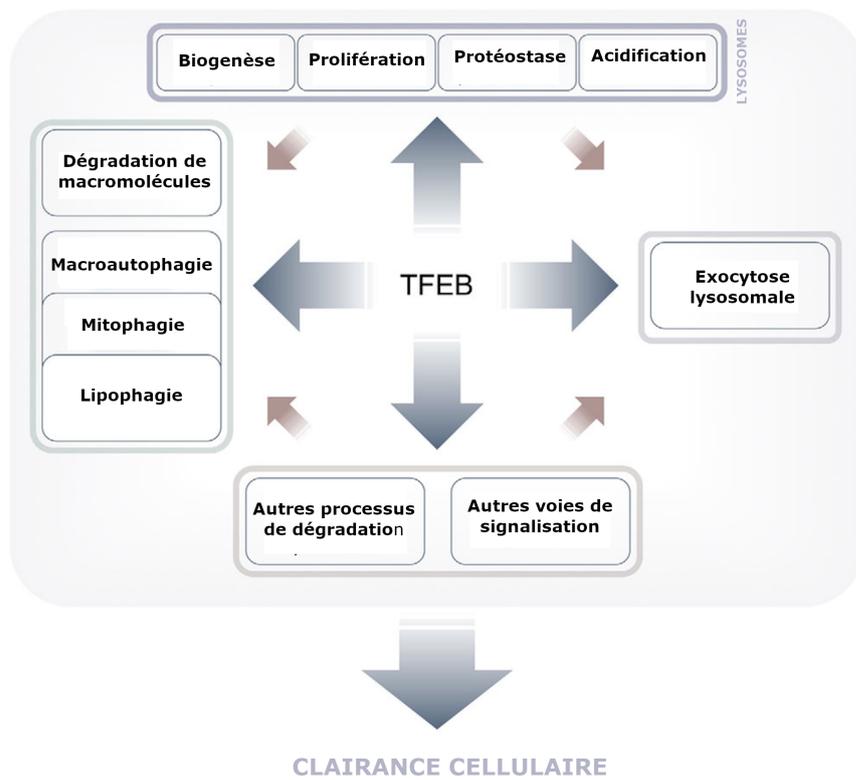
A**B**

Figure 5.1.: Gènes et mécanismes cellulaires régulés par TFEB

(A) La surexpression du TFEB entraîne l'activation d'un large panel de gènes lysosomaux, avec un effet fort sur les cathepsines. (B) Elle promeut également un grand nombre de mécanismes associés aux lysosomes et à l'autophagie. Le TFEB participe donc de façon très large à la clairance cellulaire. (Sources :SARDIELLO et al., 2009 ; SARDIELLO, 2016)

TFE3 et MiT sont aussi régulées par mTORC1 et contribuent, de la même façon, à la régulation de la voie lysosomale-autophagique. D'autres kinases participent également à la phosphorylation du TFEB : **ERK2** — pour "Extracellular signal-Regulated Kinase 2" — (aussi appelée MAPK1) qui phosphoryle la Ser142, la **GSK3 β** — pour "Glycogen Synthase Kinase 3" — qui phosphoryle la Ser134 et la Ser138, la **PKB** — pour "Protein Kinase B" — (aussi appelée Akt) qui phosphoryle la Ser467 ou la **MAP4K3** — pour "Mitogen-Activated Protein 3 Kinase Kinase Kinase Kinase 3" — qui serait nécessaire pour la phosphorylation par mTORC1 sur la Ser211. Les phosphorylations par mTORC1, ERK et GSK3 β démasqueraient un signal d'export nucléaire permettant la rétention du TFEB dans le cytosol. La phosphorylation sur la partie C-terminale du TFEB par Akt semble, elle, plus contrôler sa stabilité que sa localisation. Le TFEB peut également subir des acétylations sur la lysine 116, cette nouvelle modification post-transcriptionnelle régulerait sa fonction dans les microglies. Plus précisément, l'interaction du TFEB avec la protéine sirtuine 1 (SIRT1) dans le noyau entraîne sa déacétylation, ce qui augmenterait son activité transcriptionnelle (BAO et al., 2016).

À l'inverse, deux phosphatases sont connues comme permettant la déphosphorylation du TFEB et son entrée dans le noyau : la calcineurine et la phosphatase 2A (**PP2A**). La première, ayant lieu sur les Ser211 et Ser142, est activée suite à une libération locale de Ca²⁺ par le lysosome *via* le canal MCOLN1 (ou TRPML1). Ce mécanisme constitue une boucle de rétrocontrôle positive par le TFEB, car MCOLN1 est également une cible directe de ce facteur de transcription.

D'autres mécanismes participent à la régulation du TFEB, et notamment (1) une inhibition de son activité transcriptionnelle par le facteur de transcription à doigts de zinc ZKSCAN3, (2) la diminution de ses niveaux d'ARN messagers par le micro-ARN 128 (miR128) et enfin (3) une autorégulation transcriptionnelle grâce à la présence sur sa propre séquence du motif CLEAR.

Les revues suivantes ont également servi à la rédaction de cette partie : BALLABIO, 2016; NAPOLITANO et BALLABIO, 2016.

5.4.2 Altérations du TFEB dans la maladie d'Alzheimer

Parmi les mécanismes menant à la rupture de la dégradation lysosomale-autophagique dans la MA, la dérégulation du TFEB semble jouer une place importante. En

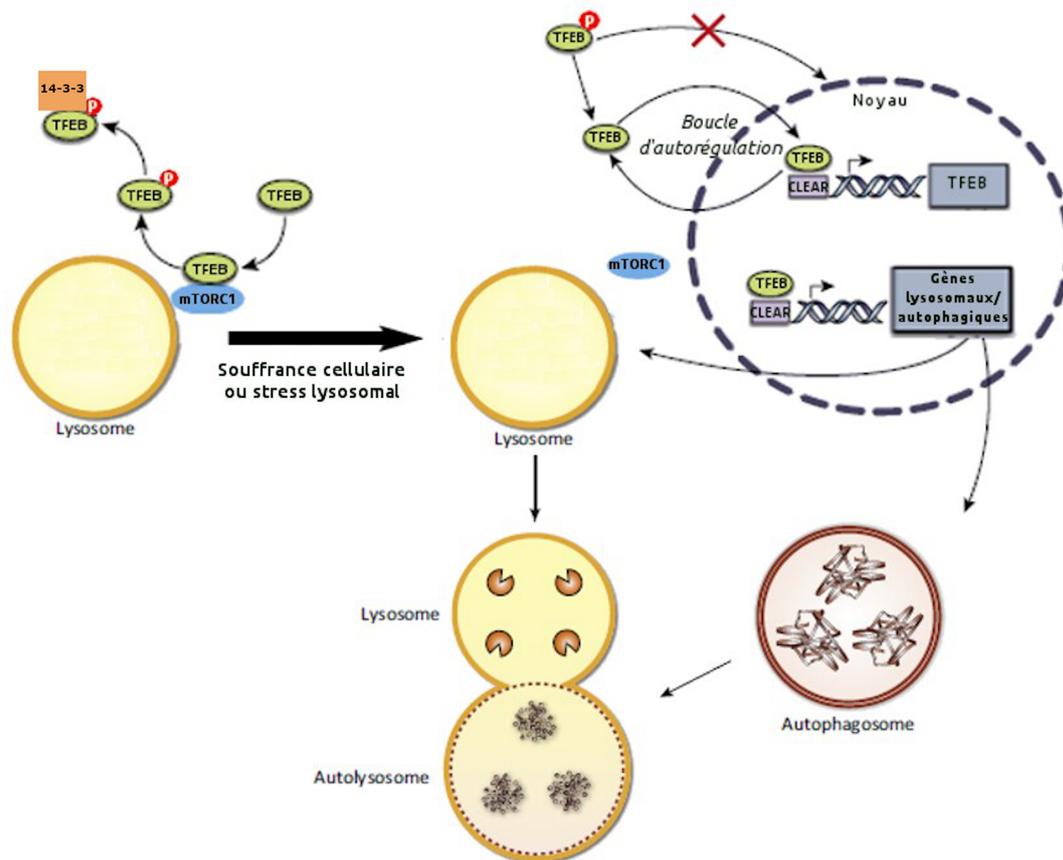


Figure 5.2.: Mécanisme d'action du TFEB dépendant de mTORC1

Schéma simplifié du mécanisme d'action du TFEB dans la cellule. En condition normale, il est retenu dans le noyau grâce à sa phosphorylation et son interaction avec la protéine 14-3-3. Suite à une souffrance cellulaire ou un stress lysosomal, il est transloqué dans le noyau permettant l'activation d'un grand nombre de gènes lysosomaux et autophagiques. (Sources : MARTINI-STOICA et al., 2016)

effet, le TFEB est fortement exprimé dans le SNC et normalement actif dans les neurones, les microglies et les astrocytes. Cependant, plusieurs études suggèrent que sa localisation et son activité seraient altérées chez les patients Alzheimer, mais à ce jour les résultats de ces études sont controversés. Alors que certaines études suggèrent un dysfonctionnement de TFEB, d'autres études montrent l'inverse. Premièrement, une étude montre une baisse des niveaux d'expression de TFEB dans les cerveaux, les lymphocytes et les monocytes des patients Alzheimer. Cette baisse est en accord avec la réduction de l'activité du système CLEAR dans les fibroblastes et iPSC dérivées de neurones humains. Cette diminution des niveaux de TFEB pourrait être causée, en partie, par le miR128, dont les niveaux sont augmentés chez les patients Alzheimer. D'autre part, dans les cas sporadiques, la possession de la forme APOE4 pourrait participer à cette dérégulation. En effet, des expériences de modélisation informatique et de co-immunoprécipitation suggèrent que l'APOE4 ferait compétition avec la TFEB, pour sa fixation sur la séquence CLEAR (PARCON et al., 2018). Deuxièmement, une étude basée sur un fractionnement subcellulaire d'échantillons de cerveau de patients Alzheimer, a montré une diminution de la localisation nucléaire du TFEB, corrélant fortement avec la progression de la maladie (H. WANG et al., 2016b). Ce défaut de localisation pourrait s'expliquer, dans certains cas familiaux, par une perte de fonction de la PS1 qui entraîne une augmentation de la phosphorylation de TFEB par mTORC1, via une réduction de la sestrine 2 (SESN2) (REDDY et al., 2016). Cependant, il n'y à ce jour, à ma connaissance, aucune évidence montrant que la rétention du TFEB dans le cytoplasme soit directement liée à l'accumulation de protéines agrégées A β ou de Tau, comme cela a pu être démontré dans le cas de la maladie de Parkinson où l' α -synucléine séquestre le TFEB dans le cytoplasme au niveau des corps de Lewy, grâce à sa capacité de protéine chaperonne (DECRESSAC et al., 2013).

En opposition avec ces observations suggérant une activité réduite du TFEB dans la MA, d'autres études montrent une augmentation des niveaux de TFEB, notamment dans les neurones pyramidaux d'hippocampe de patients Alzheimer ou des fibroblastes dérivés de malades FAD portant la mutation PS1 A246E. À noter que ces fibroblastes présentent cependant une alcalinisation des lysosomes et une activité de la cat D réduite. Dans les neurones pyramidaux (CA1) les niveaux élevés de TFEB sont corrélés avec une augmentation des gènes autophagiques en microarray et confirmée en qPCR sur une cohorte indépendante. De plus, les auteurs ont observé un grand nombre de cellules présentant une localisation nucléaire du TFEB. Cette suractivation a été validée par une analyse transcriptomique montrant une

augmentation similaire des gènes autophagiques. D'autre part, l'augmentation des transcrits de TFEB et de ses cibles a également été corrélée avec le déclin cognitif, grâce à la comparaison de patients sains, MCI et déments (BORDI et al., 2016). Cette même équipe suggère également, cette fois chez la souris, une activation du TFEB dans les astrocytes en réponse à la tauopathie, qui se traduit par une augmentation de la localisation nucléaire du TFEB et une augmentation des niveaux protéiques de ses cibles (MARTINI-STOICA et al., 2018).

Ces effets contradictoires quant à l'activité du TFEB chez les patients Alzheimer peuvent être liés (1) à des analyses à des stades différents de la maladie, montrant à nouveau une pathologie progressive, comme évoqué dans la partie 4.3 [Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer](#) et/ou (2) liés à des types cellulaires analysés différents. Il est connu que l'activation du TFEB dépend fortement du type cellulaire. Enfin, une étude GWAS réalisée a montré que le TFEB contrôle l'expression de 10 loci associés aux SAD, dont BIN-1. Une autre étude réalisée sur une population mixte américaine/africaine a montré un lien entre un variant de TFEB (au niveau de la région intronique) et le risque de développer une forme tardive de la MA. Néanmoins, aucune donnée ne renseigne sur l'effet de ce variant sur l'activité du TFEB.

5.4.3 TFEB : cible thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer ?

Suite aux études démontrant des effets bénéfiques du TFEB dans de nombreux modèles de protéinopathies, comme les maladies lysosomales (LSD) — pour "Lysosomal Storage Disease" — ou des maladies neurodégénératives, comme la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington ou la sclérose amyotrophique latérale (NAPOLITANO et BALLABIO, 2016), plusieurs travaux se sont penchés sur l'étude de l'effet du TFEB dans des modèles de souris Alzheimer. Dans un premier temps, ces études ont révélée des effets bénéfiques de TFEB dans la pathologie liée à tau. Une première stratégie a consisté à surexprimer le TFEB grâce à des adénovirus associés (AAV) dans le cerveau de nouveaux-nés des modèles 5xTgFAD (modèle Alzheimer) ou rTg4510 (modèle tauopathie). Il a été observé que la surexpression de TFEB entraîne une diminution de la pathologie Tau, de la neuroinflammation, de la

neurodégénérescence hippocampique ainsi qu'une amélioration des déficits synaptiques et cognitifs dans le modèle rTg4510. Cependant, aucun effet n'est observé sur les dépôts amyloïdes dans les souris 5xFAD. Dans cette étude, l'augmentation des gènes lysosomaux-autophagiques est faible, les auteurs concluent donc que l'effet de TFEB sur la dégradation de Tau passerait par une activation de la protéine PTEN — pour "Phosphatase and TENsin homolog" — plutôt que par une stimulation générale du système lysosomal-autophagique. C'est pour cette même raison, selon les auteurs, que le TFEB n'a pas d'effet sur la pathologie liée à l'A β . Un point important est révélé également avec cette étude : le TFEB semble cibler uniquement les protéines Tau hyperphosphorylées ou mal repliées, qu'elles soient sous forme solubles ou agrégées, montrant la spécificité de cette stratégie (POLITO et al., 2014). L'effet du TFEB sur la pathologie Tau et sur les déficits synaptiques et cognitifs associés, a été confirmé par dans d'autres modèles *in vivo*, notamment chez les souris dans lesquelles le TFEB a été surexprimé par transgénèse (H. WANG et al., 2016b). De façon intéressante, la surexpression de TFEB dans le modèle P301S/TFEB induit également une réduction significative des granules de lipofuscine, contenant des membranes non-digérées et des protéines agrégées. Ce résultat est en accord avec une étude montrant que la surexpression de TFEB peut favoriser la clairance de lipofuscines de fibroblastes dérivés de patients (MEDINA et al., 2011). Dans une étude utilisant le modèle de tauopathie PS19, la surexpression du TFEB spécifiquement dans les astrocytes, grâce à une injection d'AAV-GFAP-TFEB en ICV en post-natal, permet de réduire la pathologie Tau dans l'hippocampe (MARTINI-STOICA et al., 2018). Enfin, la surexpression de TFEB semble également ralentir la propagation de Tau vers le côté contralatéral dans un modèle, certes artificiel, de propagation, suggérant un rôle bénéfique de TFEB sur la propagation de la maladie. Toutefois, cette stratégie de surexpression ne permet pas de réduire la pathologie Tau chez des souris rTg4510, qui est un modèle plus agressif de tauopathie.

Le groupe du Dr Lee-Moo a été le premier à démontrer les effets bénéfiques d'une surexpression de TFEB dans la pathologie liée à l'A β . Dans une première étude, ce groupe a étudié la surexpression du TFEB spécifiquement dans les astrocytes dans un modèle de souris APP/PS1. En effet, l'injection stéréotaxique d'AAV-GFAP-TFEB chez des souris de 6 mois induit une réduction des niveaux totaux d'A β et de la charge amyloïde, grâce à la capture et la dégradation d'A β par les astrocytes (XIAO et al., 2014). Cette même équipe a ensuite démontré dans le même modèle, que la surexpression du TFEB dans les neurones, induite par une injection stéréotaxique d'AAV-CMV-TFEB, permet de diminuer les niveaux d'APP, de C99 et C83, d'A β

et les dépôts amyloïdes. Ces auteurs expliquent ces effets par une augmentation de la dégradation lysosomale de l'APP endocyté (XIAO et al., 2015). Dans ces deux études, l'expression du TFEB permet également de diminuer la concentration d'A β dans le liquide interstitiel cérébral, obtenu par microdialyse, à un stade où il n'y a pas encore de dépôt amyloïde. (XIAO et al., 2014; XIAO et al., 2015) En complément de ces études, le Dr Bao a montré que l'expression du TFEB dans des cultures primaires de microglies favorise la dégradation de l'A β en forme fibrillaires et que cet effet est augmenté lorsque le TFEB est déacétylé par la SIRT1. De plus, la surexpression d'un mutant actif de TFEB (forme déacétylée sur la Lys116) diminue les dépôts amyloïdes sur des coupes de cerveau de souris APP/PS1 (BAO et al., 2016).

Au vu des effets bénéfiques d'une augmentation de la clairance lysosomale-autophagique dans la MA *via* une expression de TFEB exogène, la recherche de petites molécules pouvant activer le TFEB endogène a connu un intérêt particulier dans le domaine de la MA. Plusieurs molécules citées dans la partie [5.2 Cibler l'autophagie](#) induisent une activation du TFEB, notamment le temsirolimus ou le trehalose (effet non-médié par la voie mTOR). D'autres drogues ont également montré des effets bénéfiques sur la clairance des protéines toxiques et les phénotypes toxiques associés à la MA, *via* une activation de TFEB, comme les inhibiteurs de la GSK3 β (Tideglucibe) ou le cyclodextrine HP β CD. Enfin, bien que le TFEB soit un substrat de mTORC1, il est intéressant de noter qu'il est insensible au traitement à la rapamycine.

Dans ce contexte, le TFEB apparaît comme une cible intéressante pour la maladie d'Alzheimer, permettant d'induire à la fois la voie lysosomale et la voie autophagique. Alors que l'effet bénéfique de cette stratégie a largement été démontré pour la pathologie Tau, des études supplémentaires sont nécessaires pour valider son intérêt dans le cas de la pathologie amyloïde, notamment sur des phénotypes plus précoces comme l'accumulation de C99 ainsi que sur les défauts synaptiques et cognitifs associés.

Axe 1 : Surexpression du facteur de transcription EB chez les souris 3xTg-AD

Cet axe constitue la majorité de mes travaux de thèse et va donner lieu, à au moins, une publication en tant que première autrice. Dans ce chapitre, je présenterai les objectifs initiaux de ce projet, un résumé de l'article en cours de préparation et enfin j'introduirai les difficultés rencontrées au cours de ce projet et quelques résultats préliminaires.

6.1 Hypothèse et objectifs

Selon des données récentes obtenues par mon équipe, le fragment C99 s'accumule de façon très précoce dans le cerveau des souris 3xTg-AD. Plusieurs indices suggèrent que cette accumulation est la cause d'un dysfonctionnement de la voie de dégradation lysosomale-autophagique : (1) le C99 s'accumule dans des compartiments endolysosomaux et autophagiques, (2) l'accumulation de C99 est indépendante des activités β - et γ -sécrétases et (3) le traitement avec des inhibiteurs des cathepsines ou avec des activateurs autophagiques influencent les niveaux de C99 *in vitro*. D'autre part, plusieurs travaux ont montré que cette accumulation de C99 est toxique dans le contexte de la maladie d'Alzheimer, notamment en altérant les fonctions endosolysomales et autophagiques et à plus long-terme les fonctions synaptiques et cognitives.

Notre hypothèse était donc qu'une activation de la fonction lysosomale-autophagique empêcherait cette accumulation de C99 et permettrait d'améliorer les phénotypes pathologiques associées à C99.

Le facteur de transcription EB (TFEB), connu pour activer à la fois la biogénèse lysosomale et l'autophagie, nous semblait un bon candidat pour cette étude. Mon projet visait donc à répondre, grâce à l'utilisation de techniques complémentaires, aux objectifs suivants :

1. valider *in vitro* l'effet de la surexpression du TFEB sur l'accumulation du C99.
2. valider *in vivo* l'effet d'une surexpression du TFEB sur l'accumulation de C99 chez la souris 3xTgAD en utilisant une approche virale (adénovirus associés (AAV8)) et en agissant à des stades différents de la pathologie.
3. étudier l'effet du TFEB sur deux altérations comportementales observées chez les souris 3xTgAD : le phénotype apathique et le défaut d'apprentissage et de mémorisation.
4. rechercher une approche pharmacologique permettant l'activation du TFEB endogène et utilisable *in vivo*.
5. étudier la fonction du TFEB dans le contexte de la MA chez les souris 3xTg-AD ou dans le cerveau de patients Alzheimer.

Les nouveautés de ce projet reposent majoritairement sur l'idée de cibler un marqueur précoce de la maladie d'Alzheimer, à savoir le fragment C99 ainsi que l'utilisation de la stratégie utilisant le TFEB pour améliorer les fonctions synaptiques et cognitives, dans un modèle reproduisant la pathologie amyloïde.

6.2 Objectifs 1 et 2 – Article 1

La surexpression du facteur de transcription EB (TFEB) réduit l'accumulation intraneuronale du fragment C99 dans le modèle triple-transgénique de la maladie d'Alzheimer

A. Bécot, I. Lauritzen, R. Pardossi-Piquard, A. Bourgeois et F. Checler

Article en préparation

Dans cet article, nous présentons les résultats ayant permis de répondre aux objectifs 1 et 2 de ce projet, c'est-à-dire la validation de la stratégie liée à une activation du TFEB pour empêcher l'accumulation de C99 *in vitro* et *in vivo* dans le modèle de souris 3xTgAD.

6.2.1 Résumé

Le but de ce projet a été de tester l'efficacité d'une surexpression du facteur de transcription EB (TFEB) sur les niveaux de C99 dans les cerveaux de souris 3xTgAD. Dans cet article, nous démontrons la validité de cette stratégie.

Dans un premier temps, l'effet du TFEB sur l'accumulation de C99 a été étudié dans plusieurs modèles cellulaires exprimant l'APP_{swE} ou le C99, de façon stable ou non. Ces expériences montrent que la surexpression transitoire du TFEB induit bien une augmentation transcriptionnelle d'un grand nombre de gènes lysosomaux-autophagiques et empêche aussi l'accumulation du C99, surexprimé ou produit par protéolyse de l'APP_{swE}. Cet effet sur la clairance du C99 passerait notamment par une activation des cathepsines B et D, connues pour avoir un rôle essentiel dans la dégradation de C99.

Dans un deuxième temps, les analyses *in vivo* révèlent que la transduction du TFEB, grâce à l'injection d'adénovirus associés (AAV8-CMV-TFEB) en intracérébroventriculaire chez des nouveaux-nés 3xTg-AD, permet (1) une expression du TFEB dans les neurones du subiculum de l'hippocampe, où s'accumule normalement le C99, (2) l'activation de la cathepsine B dans cette même aire et (3) une réduction des niveaux de C99 dans le cerveau de souris âgées de 8 mois. L'effet du TFEB sur la clairance du C99 a été confirmé également chez des souris 3xTg-AD chez lesquelles les AAV8-CMV-TFEB ont été injectés à l'âge de 4 mois par stéréotaxie, directement dans le subiculum, qui est l'aire où apparaissent les premières accumulations neuronales de C99 dans ce modèle, déjà observables à cet âge là.

En conclusion, l'ensemble de ces résultats confirme d'une part que l'accumulation précoce de C99 dans le cerveau des souris 3xTg-AD est liée à un défaut de dégradation lysosomale et indique d'autre part que l'activation du TFEB est une bonne stratégie pour éviter l'accumulation du C99 dans la maladie d'Alzheimer.

6.2.2 Article en anglais

The transcription factor EB reduces the intraneuronal accumulation of the beta-secretase-derived APP fragment C99 in cellular and mouse AD models

A. Becot¹, I/ Lauritzen¹, R. Pardossi-Piquard¹, A. Bourgeois¹, E. Duplan¹, Q. Xiao², A. Diwan², J-M. Lee² and F. Checler¹

1 IPMC UMR7275 CNRS/UNS, Laboratory of Excellence DistALZ, 660 route des Lucioles 06650 Valbonne, France. 2, Department of Neurology and the Hope Center for Neurological Disorders, Washington, US.

Keys words: Alzheimer's disease, C99, β CTF, TFEB, 3xTgAD, AAV8, lysosomes

Abstract

Alzheimer's disease-affected brains are characterized by an accumulation of extracellular senile plaques mainly composed of amyloid β ($A\beta$) peptides. Recent studies propose that $A\beta$ deposition is preceded by an intraneuronal accumulation of its direct precursor, the β -secretase-derived APP fragment C99 (or β CTF). Indeed, these studies show that in both AD mouse models and human iPSC neurons, C99 accumulation is particularly strong within organelles of the endolysosomal network and might be responsible for endosomal and lysosomal-autophagic defects related to early-stage defects in AD. Moreover, our recent study proposes that C99 accumulation can also be a consequence of defective lysosomal degradation suggesting that one way of circumventing early C99 accumulation could be to activate this degradation pathway. We here investigated the efficacy of viral gene transfer of the transcription factor EB (TFEB), a master regulator of autophagy and lysosome biogenesis, to reduce early C99 accumulation in the triple-transgenic mouse model. Two strategies were used to transduce TFEB with adeno-associated virus particles (AAVs). Viruses were injected either into the ventricles of newborn mouse brains or administered at later stages (3 months of age) by stereotaxic injection into the subiculum of the hippocampus, the first brain region accumulating C99. The effect of TFEB overexpression on C99 accumulation was also analyzed in cells overexpressing either Swedish mutated APP or C99 itself. TFEB was found to increase the expression of many lysosomal and autophagic proteins, including LAMPs and cathepsins, the key proteases involved in C99 degradation, and to strongly reduce C99 load in both cellular models and transgenic animals. Our data confirm that C99 accumulation in the 3xTgAD mouse model is linked to a defective lysosomal degradation and indicate that the

activation of TFEB is a good strategy to prevent the accumulation of this early neurotoxic catabolite.

Background

Alzheimer's disease (AD) is the most common form of neurodegenerative dementia and has been mainly associated with the accumulation of extracellular plaques composed of aggregated A β and intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) composed of hyperphosphorylated tau. A β is derived from the amyloid precursor protein APP by sequential proteolytic processing by β - and γ -secretases [1]. The initial cleavage of APP by β -secretase results in the secretion of the soluble ectodomain, sAPP β and the generation of a membrane-tethered C-terminal fragment C99 (or β CTF). Increasing evidence indicates that A β accumulation is preceded by an intraneuronal accumulation C99 and that C99 contributes to AD pathology by affecting the endolysosomal network [2-11]. The group of Dr Nixon using brain fibroblasts from Down's syndrome (DS) patients, a disorder in which patients develop an early form of AD due mainly to a third copy of APP present on chromosome 21 [12-13], was the first to identify the link between C99 accumulation and endosomal abnormalities [2]. This group showed that C99 accumulation leads to the enlargement of Rab5-positive early endosomes and altered endocytosis [2-4]. Strikingly, these abnormalities resembled those described years before by the same group in post-mortem brains from early-stage human AD-affected patients [14-16]. Moreover, we and others demonstrated that C99 accumulation also induces endolysosomal-autophagic pathology [5, 6, 8, 10]. Importantly, both of these C99-induced defects are observed in human iPSC (pluripotent stem cell) neurons carrying familial APP or PSEN1 mutations in the absence of overexpressed APP [8, 9]. Indeed, while late endosomal and lysosomal pathology were observed in monogenic iPSCs derived from AD patients carrying APP or PSEN1 mutations [8], a recent work demonstrated early endosome defects in isogenic APP and PSEN1 mutant iPSCs generated by CRISPR/Cas9 knockin [9]. Interestingly, in all these reports, the alterations were mediated by C99 itself and not by A β . Indeed, reducing the production of C99 by inhibition of BACE1 was found to prevent these defects, whereas they were amplified by the blockade of C99 proteolysis with γ -secretase inhibitors. Moreover, two recent works showed that these C99-induced endosomal alterations are associated with aberrant neurotrophic signaling and cholinergic neurodegeneration [3, 7]. More generally, early C99 accumulation in AD mouse models has been proposed to induce brain network alterations and neuronal hyperactivity [17, 18] as well as long-term potentiation deficits and cognitive impairment [6, 19-21]. In addition, a recent study using brain tissue

sections from sporadic AD-affected brains showed an anatomical and quantitative correlation of C99, but not of A β , with the degree of neuronal vulnerability to neurodegeneration and cognitive impairment [22]. Overall, these reports consistently show a key role of C99 accumulation in AD pathogenesis and thus suggest that the inhibition of early AD-associated C99 accumulation could be beneficial.

Our recent studies suggest that C99 accumulation in the 3xTgAD mouse model is not only a trigger of lysosomal pathology but also a cause of it [6]. Indeed, C99, as other APP-CTFs are known to be degraded principally through the lysosomal-autophagic degradation pathway [6, 23-27] and defects in lysosomal-autophagic degradation are a key feature of AD [28]. The basic helix-loop-helix leucine zipper transcription factor EB (TFEB) is a master regulator of lysosome and autophagy biogenesis [29]. Under physiological conditions, TFEB is phosphorylated and retained in the cytoplasm, an event which is controlled by mTOR mediated phosphorylation. Under aberrant lysosomal storage conditions, TFEB is translocated into the nucleus where it activates its target genes via the CLEAR (Coordinated Lysosomal Expression and Regulation) consensus sequence. As opposed to autophagic activators, TFEB promotes cellular clearance by regulating several steps of lysosomal-autophagic degradation, lysosome biogenesis as well as autophagosome formation and autophagosome-lysosome fusion [29, 30]. TFEB is known to upregulate more than 290 genes including cathepsins, key enzymes involved in the degradation of many neurotoxic proteins including C99 and other APP-CTFs [6, 24]. A still increasing amount of literature indicates an impaired TFEB signaling in neurodegenerative diseases and show that both exogenous expression of TFEB and pharmacological activation of endogenous TFEB can promote the selective clearance of intracellular neurotoxic proteins and can have beneficial effects in these diseases (for review see [31-33]). Thus, we aimed at investigating the potential of adeno-associated virus-mediated TFEB overexpression as an enhancer of early intraneuronal C99 clearance in the triple-transgenic mouse.

Animals and viral infection

3xTgAD (harboring β APP_{swe}, PS1_{M146V}, and Tau_{P301L} transgenes) and non-transgenic (wild-type) mice [34] were generated from breeding pairs provided by Dr. La Ferla (Irvine, USA). AAV8 viral particles (generated by the Hope Center Viral Core at Washington University) driving expression of TFEB (AAV8-cmv-Flag-TFEB) or as control (AAV8-cmv-GFP) (2.8×10^{12} vg/ml (viral genomes *per* ml)) [35] were delivered *in vivo* by means of two distinct protocols. In the first protocol, AAVs were injected into the ventricles of newborn mouse

brains as described previously [36] [6]. Briefly, newborn (postnatal day 0, P0) males and females were injected bilaterally into ventricles with 2.5µl of AAV8-cmv-TFEB or AAV8-cmv-GFP and mice were analyzed at 8 months post-AAV delivery. In the second protocol, AAVs were delivered by stereotaxic injection into the subiculum of 3 month-old female mice. Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (100mg/kg) and xylazine (24mg/kg), placed in stereotaxic apparatus and injected sub-cutaneously at the injection site with lidocaine. Viruses (2 µl per site) were then injected bilaterally into the subiculum at the following coordinates from bregma AP, -3.8, ML, 2.5 and DV, 1.5 at a flowrate of 0,4 µl/min. After surgery, animals were returned to the homecage and treated for 48 hours with carprofen added to the drinking water. Animals were euthanized 4 months post-injection, e.g at 8 months of age. For immunohistochemistry, mice were anesthetized as described above and intracardially perfused with PBS followed by 4% paraformaldehyde before collecting the brains. All animals were housed with a 12:12h light/dark cycle and were given free access to food and water and experimental procedures were in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and local French legislation.

Cell culture and treatment

Human neuroblastoma overexpressing swedish mutated APP (SH-SY5Y-APP_{swe} [37], or human embryonic kidney cells (HEK293, ATTC), naïve or stably overexpressing APP_{swe} (HEK-APP_{swe}) [38] or C99 (Lauritzen, Translational Neurodegeneration, *in press*) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml) purchased from Life Technologies (CA, USA) and with G418 or puromycin, respectively, for stable lines at 37°C/5% CO₂. One day before transfection, cells for biochemical studies were plated into 6-well plates and cells for immunocytochemistry were plated into poly-D-lysine coated coverslips placed in 12-well plates. Transient transfections of cells were carried out using lipofectamine 2000 (Life Technologies) for SH-SY5Y and JetPrime (Polyplus transfection) for HEK293 cells, according to the manufacturer's instructions, and cells were recovered 48 hours post-transfection. SH-SY5Y-APP_{swe} and HEK-APP_{swe} were transfected with TFEB cDNA or empty pcDNA3 vector, whereas naïve HEK cells were co-transfected with C99 and TFEB (or empty vector).

Immunolabeling of tissue and cultured cells

Paraformaldehyde-fixed brains (see above) were embedded in paraffin and cut on a microtome in 8 μm thick sections (Thermoscientific, France). Brain sections were treated with formic acid 50%/5 minutes followed by heat treatment in citrate buffer during 20 min. After saturation in 5% BSA/0.1% Triton, slides were incubated at 4°C overnight with primary antibodies (α -TFEB (rabbit polyclonal, Bethyl 1:1000), α -CatB (rabbit monoclonal, Abcam 1:1000), α -CatD (rabbit monoclonal, Abcam 1:1000), α -NeuN (rabbit monoclonal, Abcam 1:2000), α -Tuj (mouse monoclonal, BioLegend, 1:1000), 82E1 (mouse monoclonal, IBL 1:200), α -APPct (rabbit polyclonal, gift from Dr Fraser, 1:1000) or 22C11 (β APP N-terminal; Millipore; 1:1000)) followed by HRP-conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:1000) and DAB substrate (DAB impact, Vector LABs), Alexa Fluor-488 or Alexa Fluor-647 conjugated anti-mouse or anti-rabbit antibodies (Molecular Probes, 1:1000) and DAPI (Roche, 1:20000). Other slides were used for the 4-color IHC Opal Multiplex assay (Perkin Elmer) allowing highly sensitive protein detection using primary antibodies from identical species. Slides were pretreated as described above, incubated sequentially with primary antibodies for 1 hour at room-temperature and secondary antibodies from the OPAL kit (1/1000) and stripped at 95°C in citrate buffer for 20 min. When using the OPAL assay, it was possible to label TFEB, cathepsinB or cathepsinD, and 82E1 or APPct on the same slides. Cells in culture were fixed with paraformaldehyde, permeabilized with 0.1% Triton-X 100 for 10 minutes, saturated in 5% BSA/0.1% Tween20, probed 1 hour with primary antibodies (for TFEB detection with α -TFEB (Bethyl 1:5000) or α -Flag (Sigma 1:5000) and for APP-CTF detection with α -APPct, (gift from Dr Fraser, 1:5000), 6E10 (Covance, 1:1000) or 82E1 (IBL, 1:1000) followed by Alexa Fluor-488 and Alexa Fluor-594 conjugated antibodies (Molecular Probes, 1:1000) and DAPI (1:20000) staining. Confocal images were acquired using a Zeiss SP5 confocal or an Olympus Fluoview10 microscope for cells and an Olympus Fluoview10 confocal microscope for tissue sections. Images of tissue sections revealed with the DAB substrate was photographed using a bright field microscope (Leica).

Immunofluorescence quantification

SH-5YSY-APP^{swe} cells transfected with TFEB or the empty vector and immunolabeled at 48 hours post-transfection with α -Flag (for TFEB detection) and α -APPct (for APP-CTF detection). Images were acquired randomly using an Olympus Fluoview10 microscope and an objective 40X. A total of 6-7 images (about 100 cells each) were acquired for each condition (in 3 independent experiments). TFEB nuclear localization was calculated based on counting

instances of Flag and DAPI colocalization and divided by the total number of Flag-positive cells per image. Quantification of the intensity of APP-CTF immunolabeling was performed using a home-made quantification program allowing the detection of the total number of cells (visualized with DAPI nuclei, blue staining), TFEB-positive cells (green labeling), and APPct immunoreactivity (red staining). The quantification of APPct staining intensity was compared in TFEB-positive (green) versus TFEB-negative (blue but not green) cells (see Figure 1A).

Western blot analysis

Cell homogenates (20-40µg) were separated by Bio-Rad 12% stain-free™ TGX FastCast™ acrylamide gels or 16% tris-tricine gels (for the detection of APP-CTFs). Bio-Rad gels were photoactivated for the visualization of proteins before being electrophoretically transferred to nitrocellulose membranes using the Bio-Rad Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. Tris-tricine gels were directly transferred to nitrocellulose membranes using a conventional transfer system and boiled in PBS before saturation with skimmed milk. Membranes were blotted with the following antibodies: α -APPcter (Rabbit polyclonal, gift from Paul Fraser, 1:1000), α -Flag (Sigma, 1:5000), α -TFEB (Bethyl, 1:1000), α -CatD (Abcam, 1:1000), α -LC3 (Novus, 1:1000), α -Lamp1 (clone E5, Santa Cruz, 1:1000), or α -Actin (Sigma, 1:5000). After probing with primary antibodies, immunological complexes were revealed with HRP-conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:10000) followed by electrochemiluminescence (Westernbright™ Sirius™ and Quantum™ chemiluminescent HRP substrate, Advansta, France). Peak height of signal intensities from protein bands were quantified with ImageJ software.

mRNA extraction and qPCR

Lysis of hippocampal tissue was performed in Quizol using magnetic beads and the MagNA lyser, Roche). RNA from hippocampal tissue or cells was isolated using RNeasy mini kit (Qiagen). cDNA was synthesized from 2 µg total RNA using AMV transcriptase (Promega, Madison, WI) and oligo-dT primers. Then, samples were subjected to real-time PCR by means of a Rotor-Gene 6000 apparatus (Qiagen), using the SYBR Green Roche detection protocol. Gene-specific primers (see table) were designed with the Universal Probe Library Assay Design Center software (Roche Applied Science, France). Relative expression analysis was normalized against two reference genes, Topoisomerase1 (TOPO1) and GADPH (see table), which were amplified in parallel.

Statistics

All quantitative data were subjected to non-parametric tests, the Mann-Whitney U test for single comparison using GraphPad Prism 7. Data are represented as means \pm SEM. Statistical significance is represented by asterix * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

Results

TFEB overexpression leads to reduced APP-CTF levels in SH-SY5Y-APP_{swe} neuroblastoma, as well as in HEK-C99 and HEK-APP_{swe} cells. Previous data have shown a key role of cathepsins in the degradation of APP-CTFs including C99 [6, 24-27] and TFEB is known to induce lysosomal degradation partly by activating the expression of cathepsins. Thus, in order to determine whether TFEB overexpression affects APP-CTF levels, we transfected SH-SY5Y-APP_{swe} cells with TFEB cDNA or an empty or GFP-expressing vector (Figure 1). Although, immunoblot revealed that the levels of the TFEB protein were lower in cell homogenates at 48 hours than 24 hours post-transfection, probably due to a diluting effect linked to cell proliferation (Figure 1A), preliminary data showed highest effects of TFEB on both lysosomal proteins and APP-CTFs at 48 hours. Thus this time point was chosen for further analyses. Quantitative qPCR was performed to analyze the effects of TFEB overexpression on various lysosomal and autophagic genes known to be induced by TFEB [29]. In SH neuroblastoma, many genes were significantly upregulated, but interestingly, TFEB had strong effects on the expressions of cathepsin mRNAs and particularly on the expression of cathepsin D, one of the main enzymes known to degrade C99 (Figure 1B). As previously described, TFEB also enhanced the expression of the lysosomal membrane proteins (Lamp) and the autophagic genes LC3 and p62 mRNA, while APP expression remained unaffected indicating that TFEB did not transcriptionally regulate APP (Figure 1B). To determine the intracellular localization of TFEB in SH-SY5Y cells, we performed immunocytochemistry (Figure 1C). In this cell line, most cells displayed both cytoplasmic and nuclear staining, but clearly the number of cells displaying nuclear TFEB was increased in cells expressing APP_{swe} as compared to naïve cells. The treatment with the alkalization agent NH₄Cl known to block lysosomal degradation led to further increased nuclear TFEB staining (Figure 1C and 1D).

In order to assess the influence of TFEB expression on APP-CTF levels, we performed co-immunostaining of TFEB with α -APP_{ct}, which detects both full-length APP as well as APP-CTFs including C99. Strikingly, APP-CTF immunoreactivity was almost undetectable in

TFEB-positive cells (Figure 1E). By means of a home-made quantification program allowing the automatic detection of the total number of cells (nuclear stain with DAPI in blue), cells positive for TFEB (TFEB labeled in green) and APP-CTF immunoreactivity (red labeling), we found that the APP-CTF immunoreactivity in TFEB-positive cells was reduced about 80% as compared to TFEB-negative cells (Figure 1F). To further confirm this TFEB-associated effect, we performed immunocytochemistry using two other antibodies 82E1 (detecting C99 and A β , but not full-length APP or other APP-CTFs) or 6E10 (detecting C99, A β and full-length APP) (Figure 1G). Again 82E1- and 6E10-associated immunoreactivities were strongly reduced upon TFEB expression, suggesting that TFEB overexpression also potentially reduces the levels of other APP-CTFs, full-length APP and of intracellular A β . Thus, to more precisely quantify these effects of TFEB expression, we next used HEK-293 cells that are prone for efficient transfection, and performed immunoblot analysis (Figure 2). Firstly, we performed qPCR analysis and confirmed the effect of TFEB on the induction of lysosome and autophagic gene expressions (Figure 2A). As expected, the transfection efficiency was much higher in HEK293 cells (more than 3000 fold of control cells) than in SH-5YSY cells (in which TFEB expression was only about 250 times of that observed in control cells). As observed in SH-5YSY cells, TFEB expression led to a strong increase in cathepsin D gene expression, but in HEK293 cells cathepsin B mRNA levels remained unaffected. Further analysis indicated that TFEB induced the expression of Lamp1 and LC3 mRNAs, but no significant effects were found on the expression on p62 in these cells. Thus, these findings indicated a cell type specific TFEB-mediated transcriptional regulation. Next, in order to assess the effect of TFEB overexpression on C99 accumulation, we used three cell models: 1/ naïve HEK293 cells, which were co-transfected with C99 and TFEB (or empty vector), 2/ an inducible polyclonal HEK-line stably expressing C99 (Lauritzen et al. Translational Neurodegeneration. *in press*) or 3/ a monoclonal HEK cell-line stably expressing APP^{swe} [38], which were both transfected with TFEB or empty vector (Figure 2B-D). Whatever the cellular model examined, TFEB overexpression consistently led to increased levels of cathepsin D and LC3 proteins, but for unknown reasons, lamp1 protein expression remained unaffected (Figure 2B-D). More interestingly, TFEB overexpression also triggered a significant reduction in both C99 and C83 levels in all models, although the reduction of C99 was much higher in naïve HEK cells as compared to that observed in the other models (Figure 2B). Indeed, in naïve cells, C99 and TFEB were co-transfected meaning that nearly all of the cells expressing C99 also display TFEB. However, in the other models, TFEB was transfected into a stable cell line already expressing C99 or APP^{swe}. Thus, in these models a significant

subset of cells remained TFEB negative. We also investigated the effect of TFEB on full-length APP in APP^{swe} cells and found a significant reduction in only the upper band corresponding to mature and likely endocytosed APP (Figure 2D).

TFEB overexpression lowers C99 accumulation in the triple-transgenic mouse model.

The aim of our work was to explore the potential of TFEB overexpression to reduce C99 accumulation *in vivo* in the triple-transgenic mouse model. To this end, we used two strategies both based on viral-mediated delivery of TFEB by means of AAV8-cmv-TFEBs previously found to reduce A β generation and plaque deposition in the APP/PS1 mouse model [35]. In the first protocol, we delivered AAV8-cmv-TFEB or control AAV8-cmv-GFP into the cerebral ventricles of neonatal wild-type (WT) or 3xTgAD mouse brains. This technique is widely described to ensure widespread expression throughout the whole brain [36, 39] and is routinely used in our own laboratory for injecting AAV-10 particles [6]. Previous work has shown a critical role of the timing of AAV injection, since it will determine both the biodistribution and tropism [36]. Indeed, it has been shown that AAV8 particles, when injected in newborns older than about 24-48 hours, have a lower degree of diffusion and a preference for glial transduction [39]. Indeed, we confirmed in a small group of animals, that AAV8-cmv-GFP injected into mice older than 24 hours, gave rise to GFP expression localized to mostly astrocytes (not shown). However, when the same viruses were injected in younger mice (less than 24 hours after birth, P0), almost all expression was neuronal, as illustrated by the co-localization with neuronal markers such as Tuj1 and NeuN. Interestingly, GFP expression was observed within the subiculum, the area in which C99 accumulates in the 3xTgAD mouse model [11]. Thus, we decided to perform our experiments by injecting only P0 mice with AAV8-cmv-TFEB or control AAV8-cmv-GFP in order to obtain almost pure neuronal expression and mice were analyzed by immunohistochemistry at 8 months post-AAV-delivery, an age at which most intraneuronal staining with 82E1 still corresponds mostly to C99 and not to A β [11]. Surprisingly, while all animals displayed high GFP expression within the subiculum, a much fewer number of animals displayed significant TFEB expression within this area, although a similar number of viral particles were delivered. However, in these “TFEB-positive” animals, as observed for GFP, nearly all TFEB-positive cells were colocalized with NeuN (Figure 3A). Moreover, high magnification images indicated that many neurons display nuclear TFEB as observed with DAPI staining (Figure 3A). We then selected the cohort of animals displaying significant TFEB expression within the subiculum to analyze the effects on lysosomal activation and C99 accumulation. This

analysis showed a clear induction in cathepsin B expression (Figure 3B, lower panel) within TFEB positive areas (Figure 3b, upper panel), and also revealed a strong reduction in 82E1-immunostaining corresponding to C99. Indeed, TFEB expression led to a strong decrease in the number of 82E1-positive cells and also decreased the intensity of immune-staining in the remaining 82E1-positive neurons (Figure 3B, middle panel). These effects were not quantified because of the low number of TFEB-expressing animals.

In the second protocol, AAV8s were injected stereotaxically and bilaterally into the subiculum of 3 month-old animals (Figure 4 and 5). At this age, C99 accumulation has started but remains relatively low [11]. Mice were again analyzed at 8 months of age by immunohistochemistry. First, immunohistochemistry confirmed the expression of TFEB in the subiculum. As a difference to icv injected newborn mice, we observed a good diffusion of AAVs within almost the entire subiculum in all injected mice (Figure 4A). Higher magnification images of the subiculum showed that TFEB was localized to both the cytoplasm and nucleus and the morphological shape of TFEB-positive cells indicated that most of these cells corresponded to neurons. This was confirmed by co-labeling with NeuN (Figure 5A). Here again, the overexpression of TFEB strongly reduced C99 accumulation, as visualized both by both horseradish-conjugated antibodies and DAB development (Figure 4B) and co-immunostaining revealed with fluorescent-conjugated antibodies (Figure 5B-C). In both cases, the number and intensity of C99-positive neurons were clearly reduced in TFEB-positive mice as compared to the GFP-positive controls. High magnification images of co-immunostaining of TFEB and 82E1 indicated that only TFEB-positive neurons displayed reduced 82E1 immunoreactivity (Figure 5C).

Discussion

Lysosomal-autophagic dysfunction is known to be a frequent feature of AD, which precedes the classical late-stage hallmarks A β plaques and neurofibrillary tangles [28]. The transcription factor EB (TFEB) is one of the key regulators of lysosomal-autophagic function [29]. TFEB regulates both lysosomal biogenesis and autophagy by coordinating the expression of lysosomal hydrolases, lysosomal membrane proteins, as well as autophagy genes in responses to lysosomal stress conditions. Numerous studies suggest that the lysosomal-autophagic dysfunction in AD is related to a defective TFEB function proposing TFEB-mediated activation as a candidate strategy to counteract disease progression in this pathology. However, contrasting findings regarding TFEB in AD brain tissue have been reported. One study reported that TFEB is retained within the cytoplasm and lowered in

nuclear fractions of hippocampi from late-stage Braak AD brains [40], thus leading to reduced TFEB-mediated activation of the CLEAR network. A similar situation was described in Parkinson's disease, in which α -synuclein acts as a sequestering molecule and impedes the translocation of TFEB to the nucleus [41]. There are no evidences of similar effects on TFEB sequestering by aggregate-prone proteins in AD, but other mechanisms leading to TFEB dysfunction have been proposed. One study demonstrated that TFEB function is dependent on PSEN1 and is negatively impacted by AD-associated PSEN1 mutations, a mechanism which may explain at least TFEB dysfunction in some familial AD cases [42]. Another study showed that apolipoprotein E4, the main AD susceptibility risk factor [43], binds to the CLEAR motif and competes with TFEB binding thus suppressing autophagy activation in APOE e4/e4 carriers [44]. In contrast to these studies, others have reported a gain of TFEB activity in AD. For instance, microarray analysis of CA1 neurons from AD patients revealed an up-regulation of a high number of autophagic genes regulated by TFEB [45]. Many of these genes, including cathepsin B and D and Lamp1 were validated by qPCR in AD brain from independent cohorts [45]. Moreover, immunohistochemistry showed a higher number of cells displaying nuclear TFEB [45] in pathological brains. Similar up-regulation of autophagic genes was observed in transcriptomic analysis of brain of the 5xFAD mouse model [46]. Here, we used qPCR measurements to analyze the endogenous levels of TFEB and some of its targets including the C99-degrading enzymes cathepsin B and D, in hippocampi of 3xTgAD and WT mice. Indeed, TFEB itself, known to be transcriptionally autoregulated, as well as cathepsin B and cathepsin D, were significantly up-regulated in 3xTgAD mice (data not shown). Accordingly, we found a high number of neurons displaying nuclear TFEB staining within the subiculum of the 3xTgAD mouse. Also in SH-5Y5Y-APP_{swe} cells the nuclear localization of overexpressed TFEB was strongly increased cells as compared to control cells.

Although it remains unclear to what extent TFEB function is defective in AD, previous studies from AD cell and mouse models indicate that both the pharmacological and genetic activation of TFEB could have beneficial effects. In a first study, TFEB was delivered by injecting of AAVs into the lateral ventricles of newborn mouse brains of rTg4510 and 5xFAD mice, which develop progressive tau and A β associated pathology, respectively. [47]. Whereas, TFEB was found to strongly reduce tau pathology in the rTg4510 mouse, no affect was observed on A β pathology in the 5xFAD mouse. Since a very modest activation of lysosomal-autophagic activation was observed in these in vivo models, it was proposed that these effects on tau were linked to a TFEB-mediated activation of PTEN (phosphatase and

tensin homolog) rather than to a general activation of lysosomal and autophagic biogenesis [47]. A similar argument was used to explain the lack of A β modulation in the 5xFAD mouse. Two other studies demonstrated beneficial effects of TFEB on tau pathology in the tau-P301S model after neuronal or astrocytic TFEB overexpression, respectively [48, 49]. In the latter study, TFEB mediated a strong decrease in tau pathology, whereas using a similar approach in a more aggressive tau pathology model the rTg4510 mouse TFEB had no effects. The first beneficial effect of TFEB overexpression on A β -related pathology was observed after TFEB-mediated stimulation of astrocytic A β degradation in the APP/PS1 mouse [50]. Another work demonstrated in an in vitro model of brain slices of AP/PS1 mouse brains, that microglial expression of TFEB facilitates fibrillar A β degradation, an effect that was found to be further enhanced by deacetylation of TFEB by Sirt1 [51]. Moreover, neuronal overexpression of TFEB was found to reduce A β levels, an effect which was proposed to be due to an enhanced lysosomal degradation of endocytosed APP [35]. In the present work, we used AAV8-cmv-TFEB particles [35] to investigate the efficiency of TFEB in reducing early C99 accumulation in the 3xTgAD mouse model, a model displaying early C99 accumulation in the absence of detectable A β [11]. Our previous studies suggested that this accumulation of C99 was a cause of a defective lysosomal degradation rather than a consequence of increased BACE1 activity or reduced γ -secretase processing. We here show that the overexpression of TFEB leads to decreased C99 levels in both cellular AD models and in the 3xTgAD mouse model. The reduced C99 accumulation was associated with an increased expression of several lysosomal and autophagic genes, including cathepsin B and more importantly cathepsin D, the main proteases responsible for C99 degradation [6, 24-27]. In cellular models expressing directly the C99 fragment, TFEB also led to decreased levels of this fragment, indicating that this effect on C99 was not only due to higher degradation of endocytosed APP, but also to a direct lysosomal degradation in C99. In the 3xTgAD mouse model, a decrease of C99 was observed both when AAVs were injected into the cerebral ventricle of newborn mouse brains and when injected stereotaxically into the subiculum of 3 month-old mice, an age at which C99 accumulation had already started [11]. Previous studies have focused on the efficiency of TFEB to reduce A β burden, but our data show that TFEB can also circumvent early C99 accumulation. These findings are important taken into account the numerous recent works suggesting that C99, independently on A β , is a key contributor to early AD pathology.

Figure Legends

Figure 1

TFEB overexpression in SH-SY5Y cells leads to induction of lysosomal-autophagic genes and to reduced C99 levels. **A**, immunoblot analysis revealed the overexpression of TFEB at 24h or 48h post-transfection. TFEB is detected using α -Flag. **B**, qPCR analysis of TFEB-mediated gene transcription showed the induction of numerous lysosomal-autophagic genes. **C**, Immunocytochemical analysis of TFEB subcellular localization in control cells, SH-control, or SH-APP^{swe} or SH-APP^{swe} cells treated or not with NH₄Cl at 48 hours post-transfection. TFEB was detected using α -Flag. **D**, Bars correspond to the quantification of the number of cells with TFEB nuclear expression. **E**, SH-APP^{swe} cells were transfected with TFEB and immunostained at 48h post transfection with α -Flag (for TFEB detection) and α -APP^{ct}. Nuclei were stained with DAPI. **F**, Bars correspond to the quantification of APP^{ct} staining in TFEB-positive versus TFEB-negative cells. **G**, immunocytochemical detection of TFEB (with α -TFEB, green labeling) and 82E1 (detects C99 and A β) or 6E10 (detects APP, C99 and A β) (red labeling).

Figure 2

The overexpression of TFEB in HEK cells leads to the induction of numerous lysosomal-autophagic genes and to reduced C99 levels. **A**, Bars show the quantification of qPCR analysis of TFEB-mediated gene transcription in naïve HEK cells. **B-G**, naïve HEK cells transfected with C99 and TFEB (**B** and **E**) or HEK-C99 (**C** and **F**) or HEK-APP^{swe} (**D**) cells were transfected with TFEB and analyzed for TFEB, CatD, LAMP1, LC3, APP and APP-CTF expression by immunoblot. Bars in **E-F** correspond to the quantification (n=12 from at least 3 independent in each cell line).

Figure 3

Overexpression of TFEB in the 3xTgAD mouse mediated by intra-cerebro-ventricular injections of AAVs into neonatal 3xTgAD mice. Mice were analyzed by immunohistochemistry at 8 months of age. **A**, Left panels show co-immunostaining of TFEB (detected with α -TFEB, green) and the neuronal marker NeuN (red). Right panels show nuclear localization of TFEB with DAPI. **B**, Images illustrate co-immunostaining of TFEB (α -TFEB, green) and C99 (82E1, red) in AAV-TFEB and AAV-GFP mice. Lower panels show cathepsin B expression performed on adjacent brain slides.

Figure 4

Overexpression of TFEB mediated by stereotaxic injection of AAVs in the subiculum of 3 month-old WT and 3xTgAD mice. Immunostaining was performed in 8 month-old mice and revealed with HRP-conjugated antibodies and DAB. **A**, images show the expression of TFEB at different levels of the subiculum. High magnification images show expression in cells with the morphology typical of neurons and a localization of TFEB in both cytoplasm and nuclei. **B**, Low- and high-magnification images illustrating the staining of 82E1 in AAV-GFP and AAV-TFEB mice at the level of the subiculum.

Figure 5

Overexpression of TFEB mouse mediated by stereotaxic injection of AAVs in the subiculum of 3 month-old 3xTgAD mice. Mice were analyzed by immunostaining at 8 months of age. **A**, Images show co-immunostaining of TFEB (red) and NeuN (green) indicating that nearly all TFEB expression was localized to neurons. **B**, Immunostaining of TEFB (red) and 82E1 (green) in 3xTgAD mice injected with AAV-TFEB or AAV-GPP at the level of the subiculum. **C**, High-magnification images revealing decreased 82E1 immunostaining within TFEB positive neurons (arrows).

Table 1

Gene	species	Forward	Reverse
TFEB	mouse	5'-GAGCTGGGAATGCTGATCC-3'	5'-GGGACTTCTGCAGGTCCTT-3'
TFEB	Human	5'-CCAGAAGCGAGAGCTCACAGAT3'	5'-TGTGATTGTCTTTCTTCTGCCG-3'
LAMP1	mouse	5'-GTGGCAACTTCAGCAAGGA-3'	5'-GTGGGCACAAATGGTGGT-3'
LAMP1	Human	5'-ACGTTACAGCGTCCAGCTCAT-3'	5'-TCTTTGGAGCTCGCATTGG-3'
CatB	mouse	5'-CACACTGAAACCAGGCCTTT-3'	5'-CTTGCTGTGGTATCCAGTGTG-3'
CatB	Human	5'TCATGGCCGAGATCTACAAA-3'	5'TGACGTGTTGGTACACTCCTG-3'
CatD	mouse	5'GCCTACTGGCAGGTCCAC-3'	5'-GTGTCCACAATGGCCTGAC-3'
CatD	Human	5'GAAAGGCCTACTGGCAGGT-3'	5'TCCCTGTGTCCACAATAGCC-3'
CatL	mouse		
CatL	Human		
LC3	mouse	5'-GACCAGCACCCCAGTAAGAT-3'	5'-TGGGACCAAAACTTGGTCT-3'
LC3	Human	5'-GAGAAGCAGCTTCTGTTCTGG-3'	5'-GTGTCCGTTACCAACAGGAAG-3'
p62	mouse		

p62	Human		
Beclin	mouse	5'- GACTCGATTTGTTCCGTACA-3'	5'- GGAATAGGAGCCGCCACT-3'
Beclin	Human	5' -GGCTGAGAGACTGGATCAGG-3'	5'-CTGCGTCTGGGCATAACG-3'
Lamp2a	mouse	5'-TGCAGAATGGGAGATGAATTT-3'	5'-GGCACTATTCCGGTCATCC3-3'
Lamp2a	Human	5'-GCTCGTTCTGGTCTGCCTA-3'	5'-TGTCAAATTAAGTTCCAATGCA TAA-3'
Lamp2b	mouse		
Lamp2b	Human		
APP	mouse	5'-AGCGACAGCGTGGATTCT-3'	5'-TCGGCGACTTCTACTACTTTGTC-3'
APP	Human		
GBA	mouse	5'-GACCAACGCTTGCTGCTAC-3'	5'-ACAGCAATGCCATGAACGTA-3'
GBA	Human	5'-TCCTACCCTCGCCAACAGTA-3'	5'-GCTGCTTCTGGGTCTGTCA-3'
GADPH	mouse	5' TGTCCGTCGTGGATCTGAC-3'	5'-CCTGCTTCACCACCTTCTTG-3'
GADPH	Human	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
TOPO1	mouse	5'-CCACAGTGTCCGCTGTTTC-3'	5'-CGCTGGTACATTCTCATCAGG-3'
TOPO1	Human	5'-CCCTGTACTTCATCGACAAGG-3'	5'-CCACAGTGTCCGCTGTTTC-3'

References

- [1] Checler F (1995) Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* **65**, 1431-1444.
- [2] 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 Abeta-independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 1630-1635.
- [3] 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.
- [4] 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.
- [5] Kaur G, Pawlik M, Gandy SE, Ehrlich ME, Smiley JF, Levy E (2016) Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry* **22**, 981-989.
- [6] Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, 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**, 257-276.
- [7] Xu W, Weissmiller AM, White JA, 2nd, 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. *J Clin Invest* **126**, 1815-1833.
- [8] Hung COY, Livesey FJ (2018) Altered gamma-Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease. *Cell Rep* **25**, 3647-3660 e3642.
- [9] Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy E, Paquet D, Duffield M, Fak J, Olsen O, Darnell R, Tessier-Lavigne M (2019) A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP beta-CTFs, Not Abeta. *Neuron*.
- [10] Ying J, Sato Y, Im E, Berg M, Bordi M, Darji S, Kumar A, Mohan PS, Bandyopadhyay U, Diaz A, Maria Cuervo A, Nixon RA (2019) Lysosomal dysfunction in Down syndrome is APP-dependent and mediated by APP-betaCTF (C99). *J Neurosci*.
- [11] Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, 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**, 16243-16255a.
- [12] Wisniewski KE, Wisniewski HM, Wen GY (1985) Occurrence of neuropathological changes and dementia of Alzheimer's disease in Down's syndrome. *Ann Neurol* **17**, 278-282.
- [13] Millan Sanchez M, Heyn SN, Das D, Moghadam S, Martin KJ, Salehi A (2011) Neurobiological elements of cognitive dysfunction in down syndrome: exploring the role of APP. *Biol Psychiatry* **71**, 403-409.
- [14] Cataldo AM, Barnett JL, Berman SA, Li J, Quarless S, Bursztajn S, Lippa C, Nixon RA (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**, 671-680.
- [15] Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA (1996) Abnormalities of the endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease: relationship to disease pathogenesis. *Adv Exp Med Biol* **389**, 271-280.
- [16] 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.
- [17] Goutagny R, Gu N, Cavanagh C, Jackson J, Chabot JG, Quirion R, Krantic S, Williams S (2013) Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before Abeta overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci* **37**, 1896-1902.
- [18] Mondragon-Rodriguez S, Gu N, Manseau F, Williams S (2018) Alzheimer's Transgenic Model Is Characterized by Very Early Brain Network Alterations and beta-CTF Fragment Accumulation: Reversal by beta-Secretase Inhibition. *Front Cell Neurosci* **12**, 121.
- [19] Tamayev R, Matsuda S, Arancio O, D'Adamio L (2012) beta- but not gamma-secretase proteolysis of APP causes synaptic and memory deficits in a mouse model of dementia. *EMBO Mol Med* **4**, 171-179.

- [20] Pardossi-Piquard R, Lauritzen I, Bauer C, Sacco G, Robert P, Checler F (2016) Influence of genetic background on apathy-like behavior in triple transgenic AD mice. *Curr Alzheimer Res* **13**, 942-949.
- [21] Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, Bauer C, Checler F, Pardossi-Piquard R (2018) Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice. *Neurobiol Aging* **71**, 21-31.
- [22] Pulina M, Hiopkins M, Haroutunian V, Greengard P, Bustos V (2019) C99, not beta-amyloid, is associated with selective death of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *bioRxiv*.
- [23] Vingtdeux V, Hamdane M, Begard S, Loyens A, Delacourte A, Beauvillain JC, Buee L, Marambaud P, Sergeant N (2007) Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol Dis* **25**, 686-696.
- [24] Boland B, Smith DA, Mooney D, Jung SS, Walsh DM, Platt FM (2010) Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **285**, 37415-37426.
- [25] Asai M, Yagishita S, Iwata N, Saido TC, Ishiura S, Maruyama K (2011) An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. *FASEB J* **25**, 3720-3730.
- [26] Tian Y, Bustos V, Flajolet M, Greengard P (2011) A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of Abeta and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway. *FASEB J* **25**, 1934-1942.
- [27] Wang H, Sang N, Zhang C, Raghupathi R, Tanzi RE, Saunders A (2015) Cathepsin L Mediates the Degradation of Novel APP C-Terminal Fragments. *Biochemistry* **54**, 2806-2816.
- [28] Nixon RA, Yang DS (2011) Autophagy failure in Alzheimer's disease--locating the primary defect. *Neurobiol Dis* **43**, 38-45.
- [29] Sardiello M, Palmieri M, di Ronza A, Medina DL, Valenza M, Gennarino VA, Di Malta C, Donaudy F, Embrione V, Polishchuk RS, Banfi S, Parenti G, Cattaneo E, Ballabio A (2009) A gene network regulating lysosomal biogenesis and function. *Science* **325**, 473-477.
- [30] Settembre C, Di Malta C, Polito VA, Garcia Arencibia M, Vetrini F, Erdin S, Erdin SU, Huynh T, Medina D, Colella P, Sardiello M, Rubinsztein DC, Ballabio A (2011) TFEB links autophagy to lysosomal biogenesis. *Science* **332**, 1429-1433.
- [31] Sardiello M (2016) Transcription factor EB: from master coordinator of lysosomal pathways to candidate therapeutic target in degenerative storage diseases. *Ann N Y Acad Sci* **1371**, 3-14.
- [32] Bajaj L, Lotfi P, Pal R, Ronza AD, Sharma J, Sardiello M (2019) Lysosome biogenesis in health and disease. *J Neurochem* **148**, 573-589.
- [33] Cortes CJ, La Spada AR (2019) TFEB dysregulation as a driver of autophagy dysfunction in neurodegenerative disease: Molecular mechanisms, cellular processes, and emerging therapeutic opportunities. *Neurobiol Dis* **122**, 83-93.
- [34] Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-421.
- [35] Xiao Q, Yan P, Ma X, Liu H, Perez R, Zhu A, Gonzales E, Tripoli DL, Czerniewski L, Ballabio A, Cirrito JR, Diwan A, Lee JM (2015) Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing Abeta Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis. *J Neurosci* **35**, 12137-12151.

- [36] Kim JY, Ash RT, Ceballos-Diaz C, Levites Y, Golde TE, Smirnakis SM, Jankowsky JL (2013) Viral transduction of the neonatal brain delivers controllable genetic mosaicism for visualising and manipulating neuronal circuits in vivo. *Eur J Neurosci* **37**, 1203-1220.
- [37] Oules B, Del Prete D, Greco B, Zhang X, Lauritzen I, Sevalle J, Moreno S, Paterlini-Brechot P, Trebak M, Checler F, Benfenati F, Chami M (2012) Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J Neurosci* **32**, 11820-11834.
- [38] Chevallier N, Jiracek J, Vincent B, Baur CP, Spillantini MG, Goedert M, Dive V, Checler F (1997) Examination of the role of endopeptidase 3.4.24.15 in A beta secretion by human transfected cells. *Br J Pharmacol* **121**, 556-562.
- [39] Chakrabarty P, Rosario A, Cruz P, Siemienski Z, Ceballos-Diaz C, Crosby K, Jansen K, Borchelt DR, Kim JY, Jankowsky JL, Golde TE, Levites Y (2013) Capsid serotype and timing of injection determines AAV transduction in the neonatal mice brain. *PLoS One* **8**, e67680.
- [40] Wang H, Wang R, Xu S, Lakshmana MK (2016) Transcription Factor EB Is Selectively Reduced in the Nuclear Fractions of Alzheimer's and Amyotrophic Lateral Sclerosis Brains. *Neurosci J* **2016**, 4732837.
- [41] Decressac M, Mattsson B, Weikop P, Lundblad M, Jakobsson J, Bjorklund A (2013) TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from alpha-synuclein toxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**, E1817-1826.
- [42] Reddy K, Cusack CL, Nnah IC, Khayati K, Saqcena C, Huynh TB, Noggle SA, Ballabio A, Dobrowolski R (2016) Dysregulation of Nutrient Sensing and CLEARance in Presenilin Deficiency. *Cell Rep* **14**, 2166-2179.
- [43] 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.
- [44] Parcon PA, Balasubramaniam M, Ayyadevara S, Jones RA, Liu L, Shmookler Reis RJ, Barger SW, Mrak RE, Griffin WST (2018) Apolipoprotein E4 inhibits autophagy gene products through direct, specific binding to CLEAR motifs. *Alzheimers Dement* **14**, 230-242.
- [45] Bordi M, Berg MJ, Mohan PS, Peterhoff CM, Alldred MJ, Che S, Ginsberg SD, Nixon RA (2016) Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. *Autophagy* **12**, 2467-2483.
- [46] Landel V, Baranger K, Virard I, Loriod B, Khrestchatisky M, Rivera S, Benech P, Feron F (2014) Temporal gene profiling of the 5XFAD transgenic mouse model highlights the importance of microglial activation in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **9**, 33.
- [47] Polito VA, Li H, Martini-Stoica H, Wang B, Yang L, Xu Y, Swartzlander DB, Palmieri M, di Ronza A, Lee VM, Sardiello M, Ballabio A, Zheng H (2014) Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB. *EMBO Mol Med* **6**, 1142-1160.
- [48] Wang H, Wang R, Carrera I, Xu S, Lakshmana MK (2016) TFEB Overexpression in the P301S Model of Tauopathy Mitigates Increased PHF1 Levels and Lipofuscin Puncta and Rescues Memory Deficits. *eNeuro* **3**.
- [49] Martini-Stoica H, Cole AL, Swartzlander DB, Chen F, Wan YW, Bajaj L, Bader DA, Lee VMY, Trojanowski JQ, Liu Z, Sardiello M, Zheng H (2018) TFEB enhances

- astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading. *J Exp Med* **215**, 2355-2377.
- [50] Xiao Q, Yan P, Ma X, Liu H, Perez R, Zhu A, Gonzales E, Burchett JM, Schuler DR, Cirrito JR, Diwan A, Lee JM (2014) Enhancing astrocytic lysosome biogenesis facilitates Abeta clearance and attenuates amyloid plaque pathogenesis. *J Neurosci* **34**, 9607-9620.
- [51] Bao J, Zheng L, Zhang Q, Li X, Zhang X, Li Z, Bai X, Zhang Z, Huo W, Zhao X, Shang S, Wang Q, Zhang C, Ji J (2016) Deacetylation of TFEB promotes fibrillar Abeta degradation by upregulating lysosomal biogenesis in microglia. *Protein Cell* **7**, 417-433.

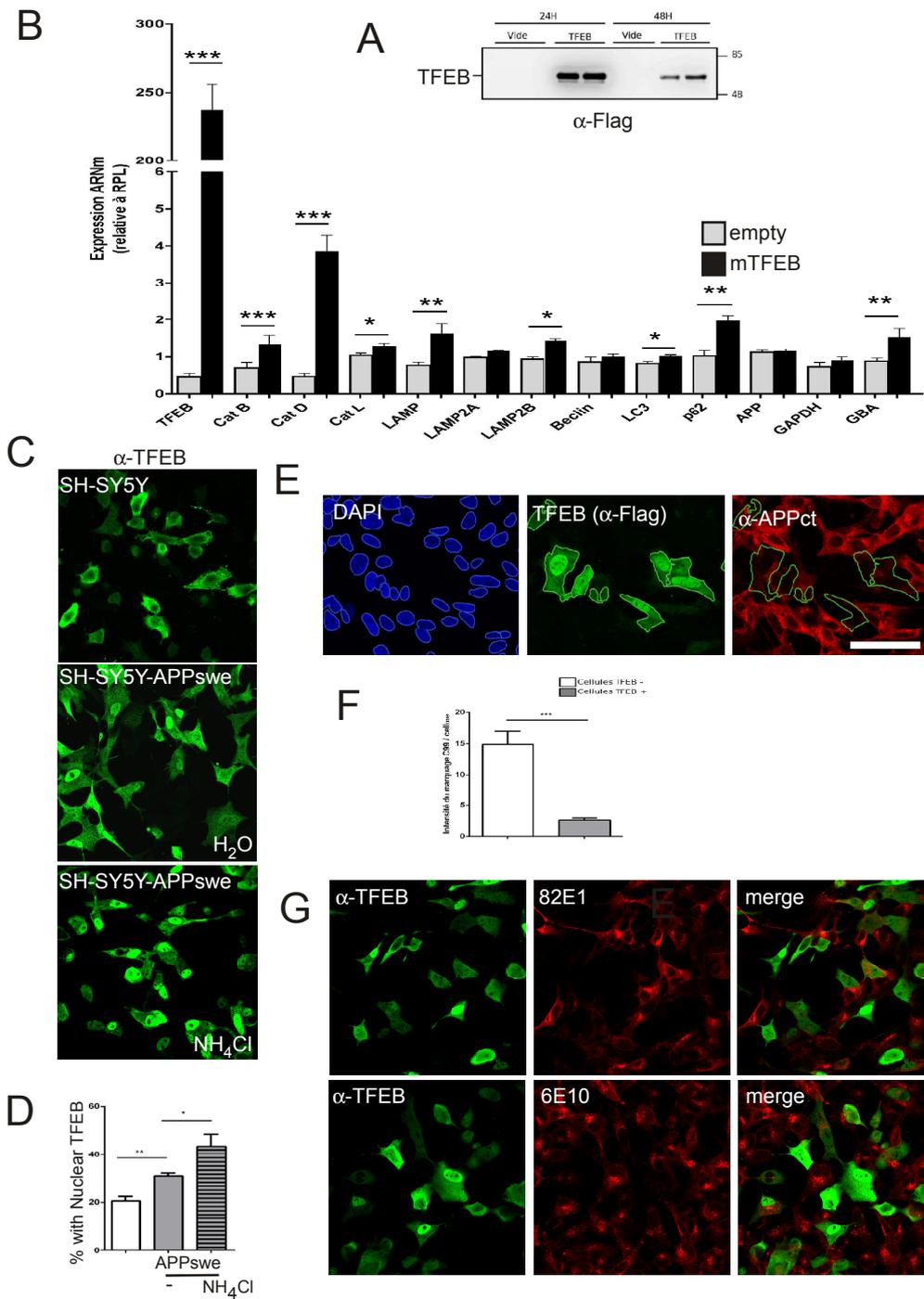


Figure 1

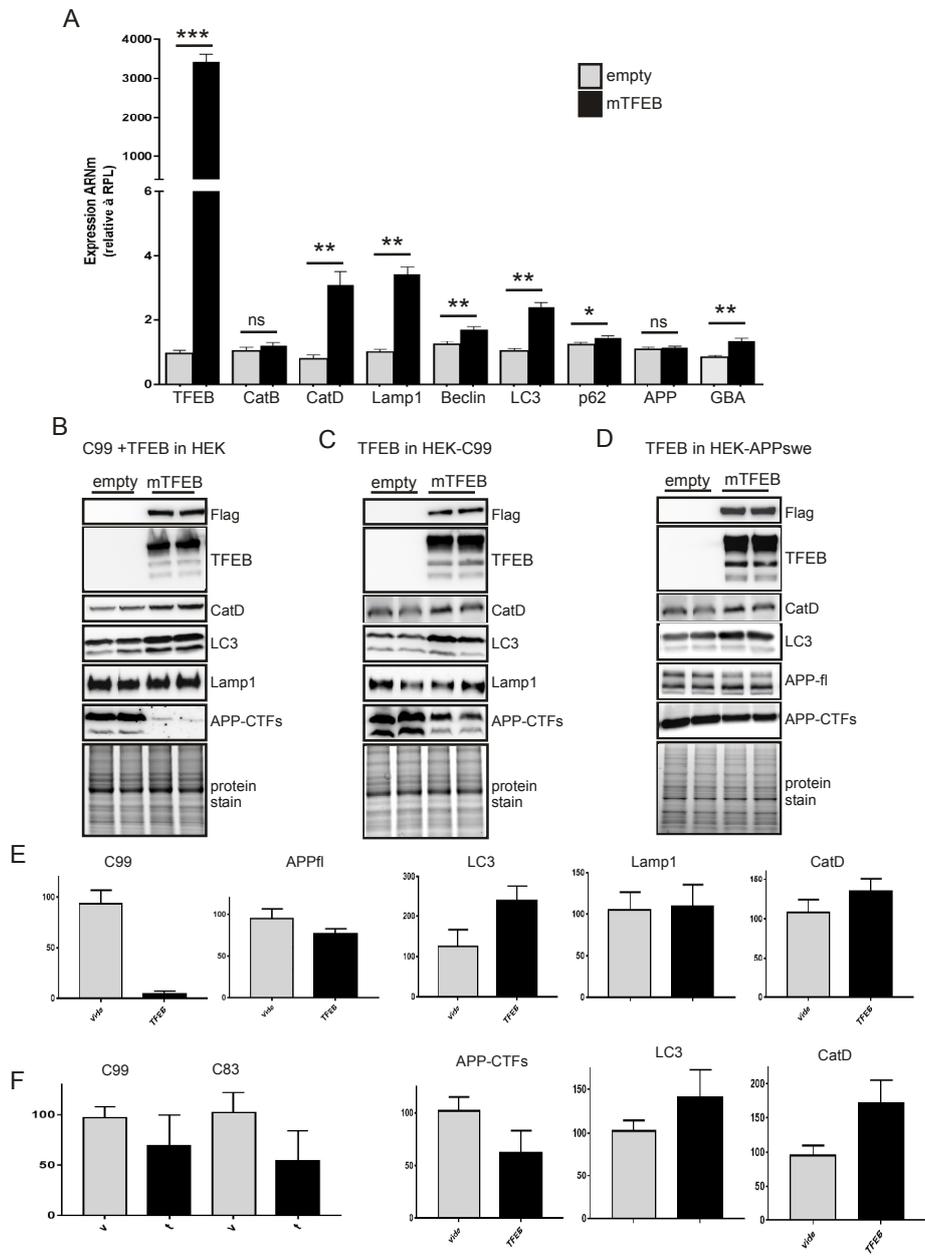


Figure 2

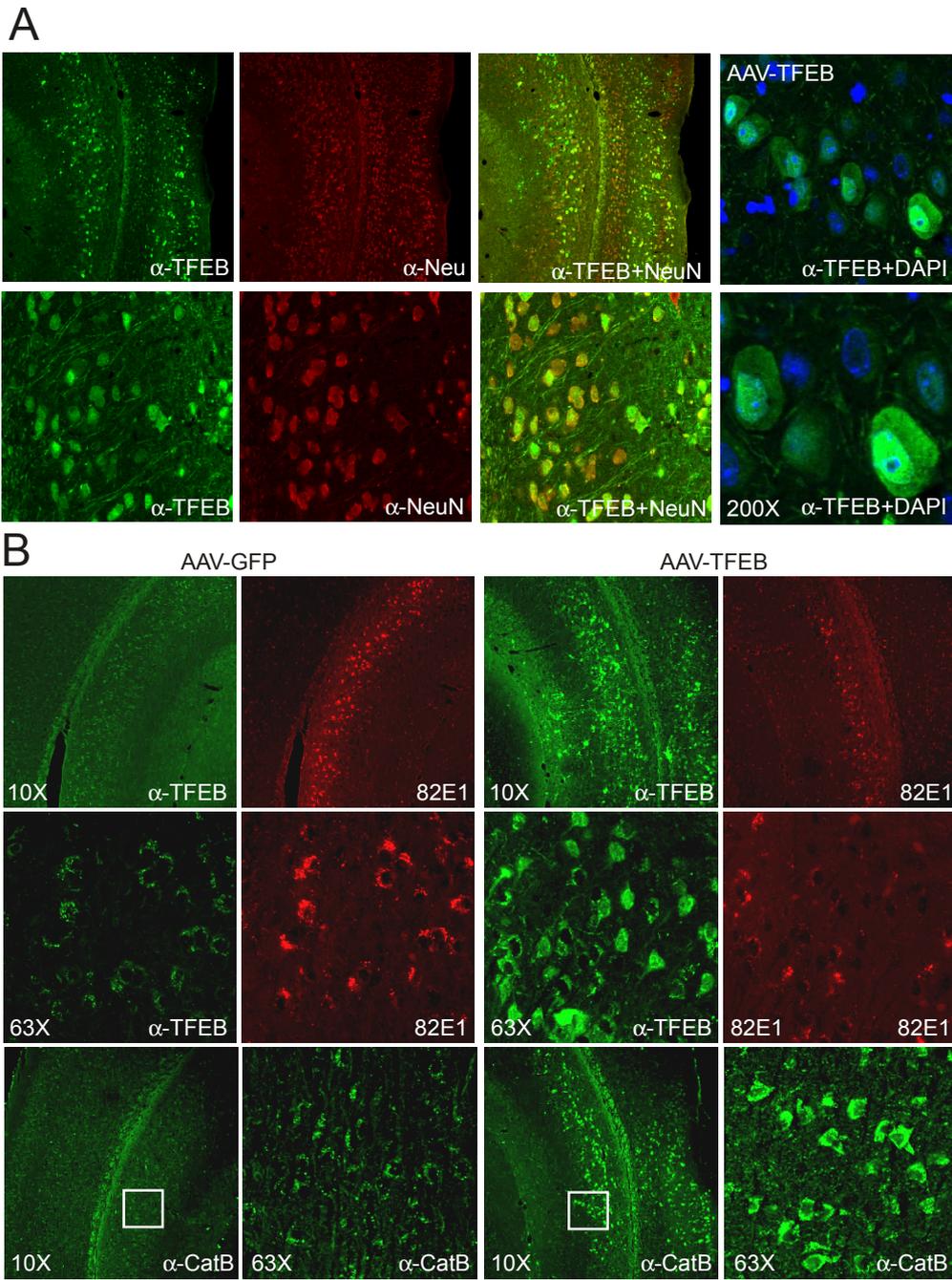


Figure 3

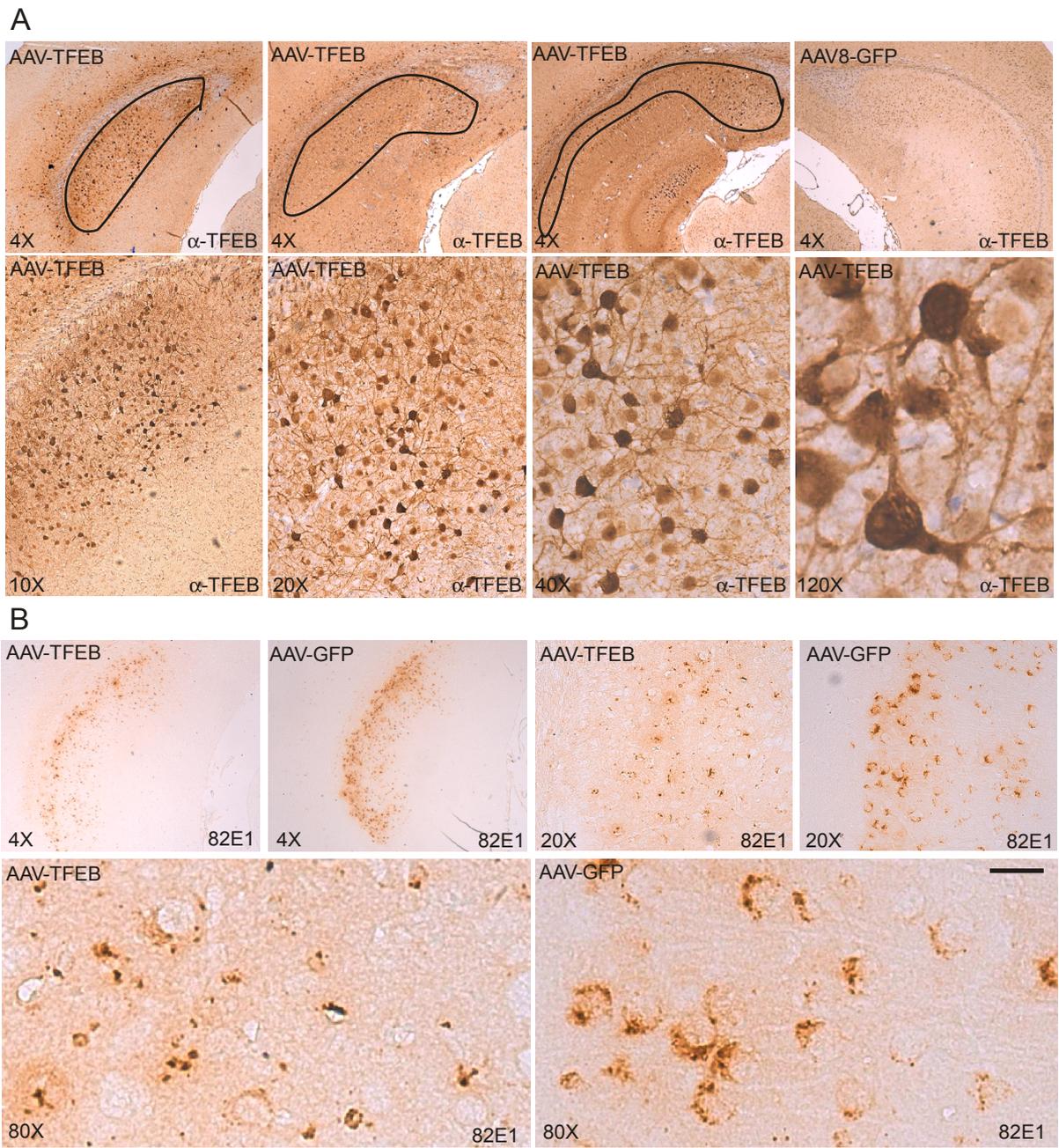


Figure 4

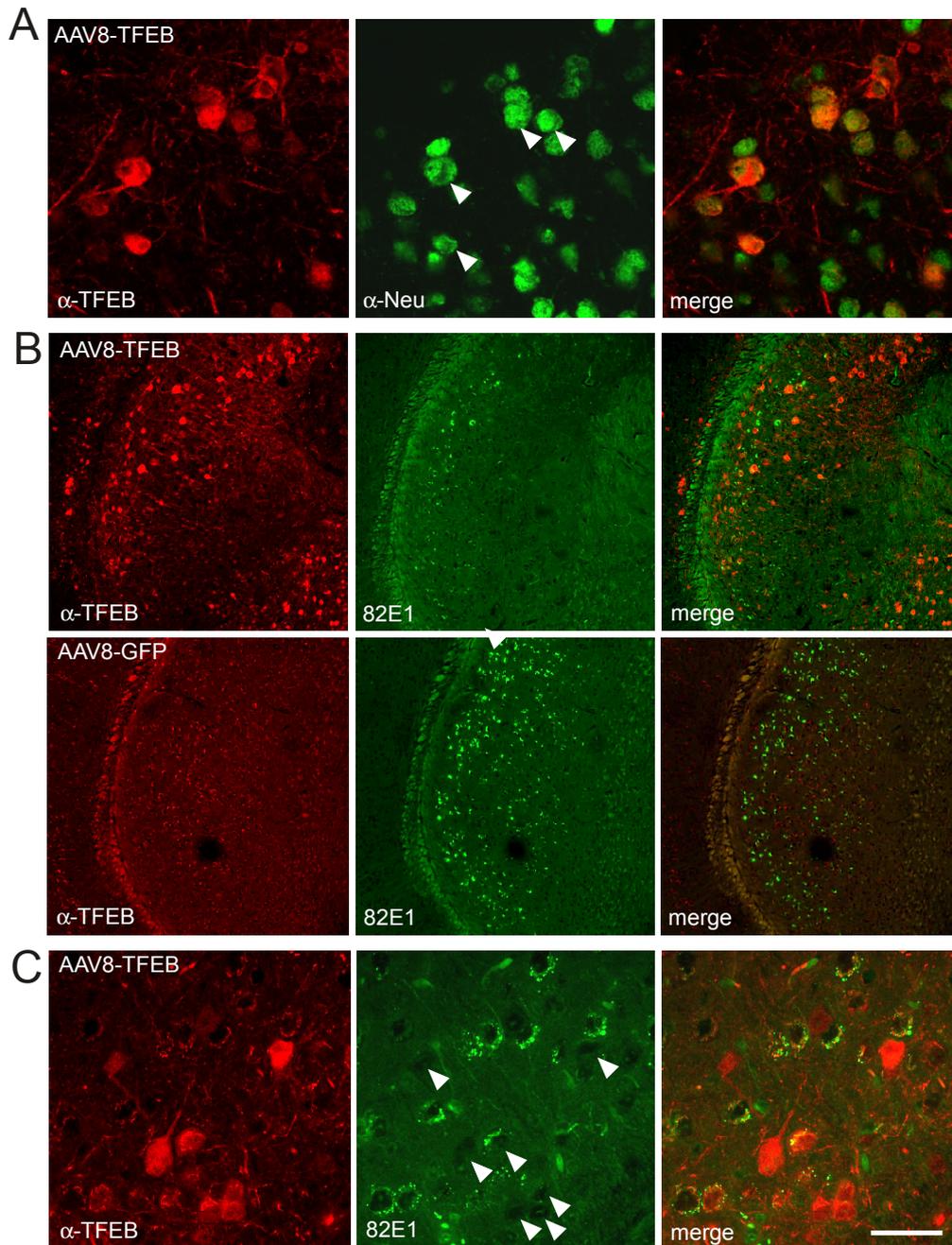


Figure 5

6.3 Objectif 3 – Analyses comportementales

Étude de l'effet de TFEB sur deux altérations comportementales observées chez les souris 3xTgAD, le phénotype apathique et le défaut d'apprentissage et de mémorisation

Bien que nous ayons validé la stratégie utilisant le TFEB pour réduire l'accumulation du C99 chez les souris 3xTg-AD, nous nous sommes heurtés à plusieurs problèmes qui ont limité la suite de l'étude, visant à déterminer l'effet de cette stratégie sur les fonctions cognitives et synaptiques. En effet, dans les premières études nous avons opté pour une stratégie virale utilisant des AAVs obtenus grâce à une collaboration avec l'équipe du Dr Jin-Moo Lee. Cette équipe avait elle-même utilisée ces virus pour démontrer une réduction des niveaux d'A β et des dépôts amyloïdes suite à l'injection stéréotaxique chez des souris APP/PS1 (XIAO et al., 2014). Ces AAVs sont de sérotype 8 et expriment soit la GFP, soit le TFEB sous le contrôle d'un promoteur universel CMV : AAV8-CMV-GFP ou AAV8-CMV-Flag-TFEB. Je détaillerai par la suite les difficultés rencontrés au cours de ce projet et quelques résultats préliminaires.

6.3.1 Injections d'AAV8-TFEB en ICV

Tout d'abord, nous avons testé une approche déjà utilisée au laboratoire dans laquelle les particules virales sont administrées par injection unilatérale en ICV chez des souris nouveaux-nés (LAURITZEN et al., 2016). Cette technique a l'avantage d'être facilement réalisable et permettre une bonne diffusion au niveau du cerveau des particules virales (J.-Y. KIM et al., 2013 ; CHAKRABARTY et al., 2013). Il a été montré dans la littérature que le sérotype et la concentration du virus, ainsi que le moment de l'injection, sont des paramètres déterminants pour la diffusion et le tropisme du virus. En effet, les AAV8s sont connus pour avoir une meilleure diffusion que les AAV1-7. Par contre, le moment de l'injection reste primordial pour obtenir une expression neuronale avec les AAV8s, car l'injection à un stade trop tardif (plus de 48h après la naissance) favorise une expression astrocytaire (J.-Y. KIM et al., 2013 ; CHAKRABARTY et al., 2013). Nous avons donc réalisé une étude préliminaire sur un nombre réduit d'animaux afin de déterminer les concentrations

virales à injecter ainsi que le moment d'injection. Ces expériences ont été réalisées avec des virus AAV-GFP afin de permettre une visualisation rapide de l'expression.

Importance du moment d'injection Dans le but d'utiliser un maximum de souris nouveau-nées, nous avons voulu savoir jusqu'à quel âge les injections pouvaient être réalisées. Nous avons donc injecté les AAVs chez des souris âgées à J0 ou à J1 et visualisé l'expression de la GFP sur des coupes flottantes (vibratome) 1 mois après l'injection. Nous avons observé chez l'ensemble des animaux une bonne diffusion du virus, suite à l'injection de 2.5 μL (soit $\approx 5 \times 10^9$ particules par souris), et notamment au niveau du subiculum qui est la zone où s'accumule le C99 (**Figure 6.1 A, panel du haut**). Cependant, comme déjà décrit dans la littérature (J.-Y. KIM et al., 2013; CHAKRABARTY et al., 2013), le type cellulaire infecté diffère en fonction du moment d'injection, et ce dès 24h après la naissance (J1). En effet, nous avons observé une expression purement neuronale de la GFP chez les souris injectées à J0 alors que dépassé ce délai, son expression est principalement astrocytaire (**Figure 6.1 A, panel du bas**). Pour la suite des expériences, nous avons donc injecté les virus uniquement dans les 24h après la naissance des souris.

Différence de diffusion entre les virus AVV-GFP et AAV-TFEB Après avoir déterminé la quantité d'AAVs à injecter ainsi que le moment d'injection, nous avons effectué l'injection d'un plus grand nombre d'animaux, des souris 3xTg-AD et des souris sauvages (3xTg-WT), possédant le même fond génétique (129/C57bl6), avec les AVV-GFP et AAV-TFEB. Puis les souris ont été analysées à 3 ou 8 mois post-injection. De façon surprenante, les analyses sur les souris injectées avec l'AAV-TFEB ont révélé un nombre très réduit d'animaux ayant une bonne expression de TFEB au niveau du subiculum que ce soit à 3 ou à 8 mois (**Figure 6.1 B**), bien que les deux groupes aient été injectés avec les mêmes quantités de virus. Au contraire, la large majorité des souris AVV-GFP présentent une forte expression dans cette aire (**Figure 6.1 A**). Pour améliorer la diffusion/l'expression de TFEB, nous avons fait l'hypothèse que l'injection d'un plus grand volume de virus (4 μL) et d'une plus grande quantité de virus pourrait induire une plus grande diffusion. Malheureusement, bien que le nombre de cellules infectées soit plus important, nous n'avons pas amélioré la diffusion du virus au niveau des neurones du subiculum. Pour les études de l'article 1, nous avons donc sélectionné les souris en fonction de l'expression du TFEB au niveau du subiculum et seules les souris ayant une bonne expression ont

été analysées. Ceci explique également qu'aucune statistique n'ait été réalisée sur cette série d'expériences.

Expression neuronale et nucléaire du TFEB Peu importe la zone infectée, nous avons observé que l'expression du TFEB est maintenue dans le temps et qu'elle est majoritairement neuronale et nucléaire. Cette observation est en accord avec une forte activation de la cathepsine B dans les mêmes aires (voir article 1). Enfin, nous avons observé une forte diminution des niveaux de C99 chez les souris exprimant le TFEB, validant malgré ces problèmes techniques notre stratégie liée à la surexpression de ce facteur de transcription (article 1). Le TFEB induit également une réduction des niveaux d'APPfl comme observé avec l'anticorps 22C11, dirigé contre la partie N-terminale de l'APP (Figure 6.1 C), proposant que cette diminution de l'APP est due à une dégradation de l'APP endocyté. Le nombre de souris étant limité nous n'avons pas pu faire de quantification et encore moins envisagé les expériences de comportement dans ces conditions.

6.3.2 Injections d'AAV8-TFEB par stéréotaxie

Dans un deuxième temps, nous avons voulu évaluer l'effet du TFEB sur la clairance du C99, en agissant à un stade où l'accumulation du C99 est déjà présente. L'avantage de cette stratégie est également de cibler la surexpression du TFEB spécifiquement dans la zone d'intérêt. Nous avons donc injecté les mêmes virus (AAV8-TFEB ou AAV8-GFP) par stéréotaxie au niveau du subiculum et en bilatérale chez des souris 3xTg-WT et 3xTgAD, dans le but de faire des analyses comportementales.

Lors de la première série de stéréotaxie, des souris âgées de 6 mois ont été injectées avec 2×10^9 particules par hémisphère, cette quantité permettant normalement d'avoir une expression convenable (J.-Y. KIM et al., 2013). Trois mois après l'infection (souris âgées de 9 mois), nous avons réalisé un test de performance cognitive (Piscine de Morris) sur les quatre groupes d'étude puis les animaux ont été sacrifiés pour des analyses immunohistochimiques ou biochimiques. L'immunomarquage de TFEB permet d'observer une bonne diffusion dans tout le subiculum et une expression majoritairement nucléaire. Malheureusement, le nombre de neurones infectés est très faible (Figure 6.2 A) et nous n'avons observé aucune activation

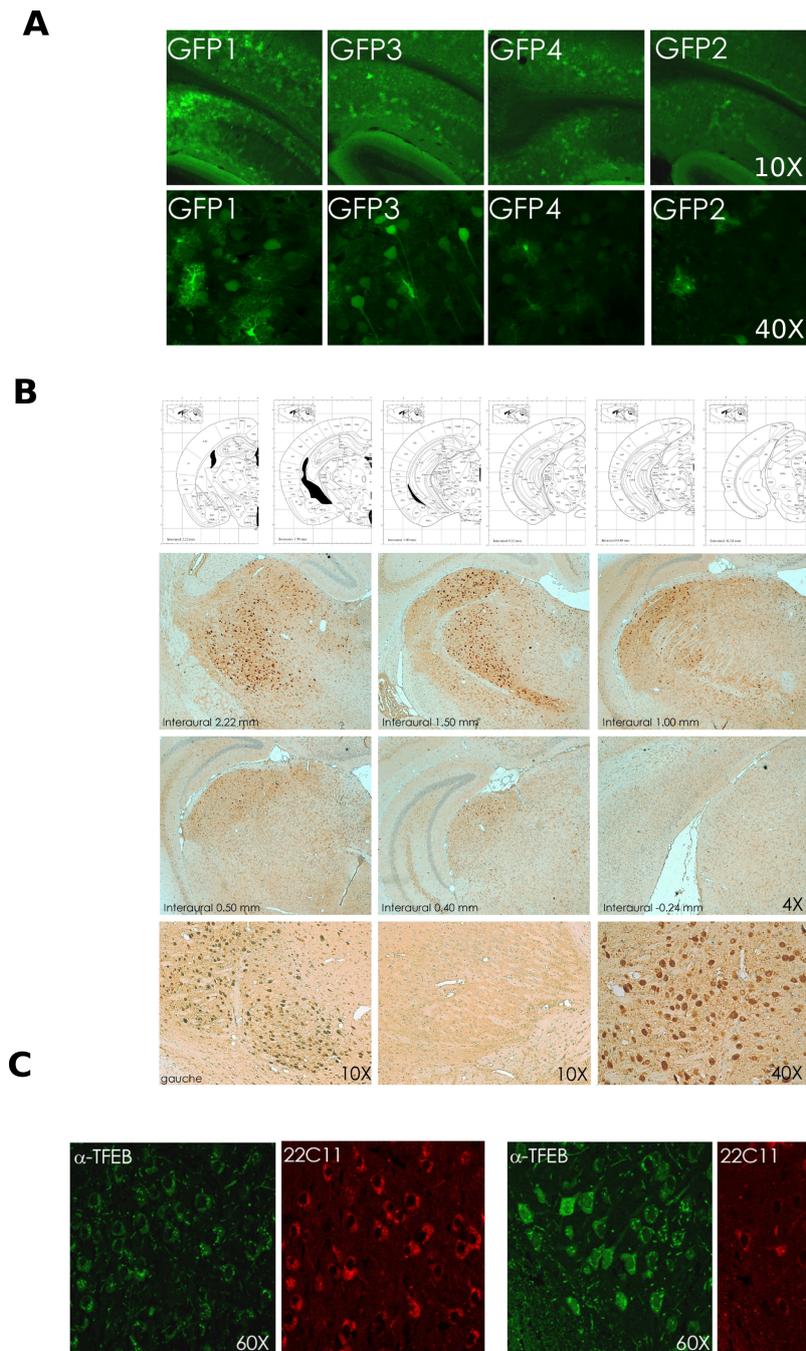


Figure 6.1.: Surexpression du TFEB chez les souris 3xTg-AD après injection en ICV des AAV8-CMV-TFEB.

(A) Images montrant l'expression de la GFP au niveau du subiculum chez 4 souris différentes après injection des AAVs entre P0 et P1. La morphologie des cellules suggèrent un tropisme différent (astrocytaire ou neuronal) en fonction des souris, probablement dû au moment d'injection. (B) Images montrant l'expression du TFEB (révélée en DAB) chez des souris injectées à P0 et sacrifiées à 6 mois. L'expression du TFEB est quasi-absente dans le subiculum. Les images à fort grossissement montrent une localisation mixte (nucléaire et cytoplasmique) dans la plupart des cellules. (C) Images montrant le co-marquage du TFEB (vert) et de l'APP (22C11, rouge) dans le cerveau de souris injectées avec les AAV-CMV-GFP (gauche) ou AAV-CMV-TFEB (droite) à P0 et analysées à 8 mois. On note la diminution du marquage 22C11 dans des neurones exprimant le TFEB.

des cathepsines et aucun effet sur l'accumulation du C99. Ceci peut donc expliquer l'absence d'effet du TFEB sur l'apprentissage et la mémorisation lors du test de la Piscine de Morris, que ce soit chez les 3xTg-WT ou les 3xTg-AD.

Donc, afin d'assurer une bonne expression de TFEB au moins pour les analyses immunohistochimiques, nous avons effectué dans une deuxième série de stéréotaxie l'injection des AAV8 sur un plus petit nombre de souris, mais en augmentant la quantité virale (de l'ordre de 5×10^9 particules/côté). Les résultats de ces expériences sont présentés dans l'article 1 et montrent une bonne expression du TFEB tout le long du subiculum et une réduction globale de l'accumulation du C99 chez les souris 3xTg-AD. À nouveau, la surexpression du TFEB entraîne également une réduction des niveaux l'APPfl et des autres APP-CTFs comme le montre le co-marquage avec l'anticorps anti-TFEB et l'anticorps dirigés contre la partie C-terminale de l'APPfl (anti-APPct) (Figure 6.2 B). À nouveau, le nombre de souris analysées était trop faible pour réaliser des analyses statistiques. Enfin, bien que cette stratégie ait montré des effets drastiques du TFEB sur l'accumulation du C99, même préexistante, il est important de noter qu'à ce stade (4 mois), cette accumulation reste encore modérée. Il serait donc intéressant de reproduire cette expérience à un âge encore plus avancé, pour valider cette stratégie en tant qu'approche curative.

6.3.3 Injections d'AAV10-TFEB en ICV

Au vu de ces résultats indiquant un effet important de la surexpression de TFEB sur l'accumulation de C99 et toujours dans le but d'étudier les effets sur les fonctions cognitives, nous avons décidé de produire des virus de sérotype AAV10, le même sérotype que celui utilisé pour obtenir les souris AAV-C99 du laboratoire et montrant une très large diffusion cérébrale, notamment dans le subiculum. Nous avons fait le choix également de remplacer le promoteur CMV par un promoteur synapsine (Syn) pour cibler une expression neuronale. Le clonage et la production des ces virus a été réalisée par nos soins. Nous avons conservé la stratégie chez le nouveau-né, permettant, d'une part d'agir avant l'accumulation du C99 et d'autre part d'agir sur une longue durée. Dans le but de réaliser une étude comportementale, un nombre élevé (plus que 15 par groupe) de souris 3xTg-WT et 3xTgAD a été injecté (de l'ordre de 9×10^8 particules par côté) en ICV et en bilatérale cette fois. Des analyses préliminaires à 1 mois post-injection ont montré l'expression du TFEB dans le subiculum et dans le cortex majoritairement. À ce jour, nous

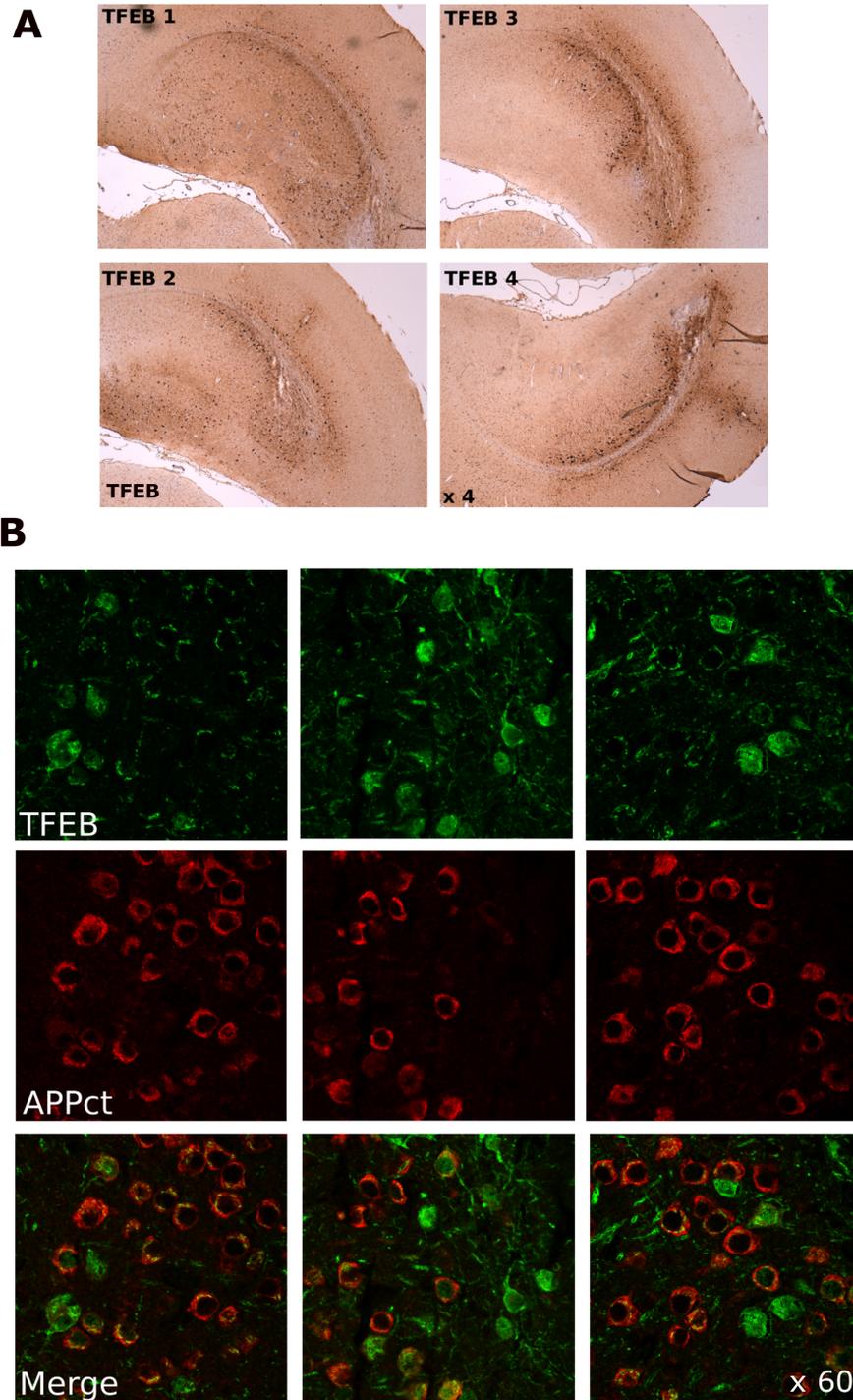


Figure 6.2.: Suroexpression de TFEB chez les souris 3xTgAD après injection en stéréotaxie.

(A) Les images montrent 4 exemples de souris injectées avec les AAV8- TFEB (2×10^9 particules/côté), dont l'expression est révélée par la méthode HRP/DAB à 6 mois post-injection. (B) Une autre série de souris a été injectée avec les mêmes AAV8-TFEB (5×10^9 particules/côté) et ont été analysées pour l'expression du TFEB (en vert) et de l'APP et des APP-CTFs (en rouge) par immunofluorescence. On note la forte diminution du marquage rouge dans les cellules positives pour le TFEB.

avons réalisé les tests d'actimétrie à l'âge de 4 mois, un âge où nous observons un phénotype apathique chez les souris 3xTg-AD (PARDOSSI-PIQUARD et al., 2016). Alors que nous confirmons ce phénotype sur les souris contrôles ayant reçu l'AAV-GFP, nous n'observons aucun effet de la surexpression de TFEB chez les souris 3xTg-AD. La suite de ces expériences (comportement, analyses biochimiques et immunohistochimiques) est en cours.

En conclusion, les analyses futures devront déterminer si la diminution des taux de C99, induite par le TFEB, dans les cerveaux de souris 3xTg-AD permet de réverser la pathologie EAL, d'améliorer les déficits synaptiques (LTP) et cognitifs (apathie, apprentissage, mémorisation) ainsi que les pathologies tardives liées à l'A β et à Tau.

6.4 Objectif 4 – Approche pharmacologique

Recherche d'une stratégie pharmacologique permettant l'activation de TFEB endogène et utilisable *in vivo*

Dans cette partie du projet, le but a été de tester plusieurs molécules décrites dans la littérature et remplissant les deux critères suivants :

1. passer la barrière hémato-encéphalique car nous envisageons une administration soit *via* l'eau de boisson, soit par injection intrapéritonéale.
2. activer le TFEB (translocation dans le noyau) et ses cibles, en particulier les cathepsines qui sont les enzymes principalement impliquées dans la dégradation du C99

D'après la littérature, plusieurs molécules sont capables d'activer la fonction de TFEB en jouant de façon directe ou indirecte sur la translocation nucléaire de TFEB et ont montré un effet bénéfique sur la clairance de protéines agrégées.

- **2-HP β -CD** favoriserait la translocation du TFEB (Y. SONG et al., 2014 ; KILPATRICK et al., 2015 ; NIXON, 2017) ainsi que la clairance de l'A β *in vivo* (YAO et al., 2012).
- **Temsirolimus**, pro-drogue de la ramapamycine, favoriserait la translocation du TFEB (DECRESSAC et al., 2013) ainsi que la clairance de l'A β ou l' α -synucléine *in vivo* (DECRESSAC et al., 2013 ; T. JIANG et al., 2014).

- **Trehalose**, disaccharide naturel, empêcherait la phosphorylation du TFEB via l'inhibition d'Akt et favoriserait la translocation de TFEB ainsi que la clairance de l' α -synucléine ou de la protéine Tau *in vivo* (PALMIERI et al., 2017 ; DEHAY et al., 2010 ; SCHAEFFER et al., 2012).
- **Tideglusibe**, inhibiteur irréversible de la kinase GSK3 β favoriserait de la clairance de l'A β et de Tau *in vivo* (ELDAR-FINKELMAN et MARTINEZ, 2011 ; MORALES-GARCIA et al., 2012 ; H. WANG et al., 2016a). D'autres inhibiteurs de la GSK3 β ont également montré un effet bénéfique *in vivo* sur la clairance d'A β et des APP-CTFs (AVRAHAMI et al., 2013 ; PARR et al., 2012). Pour rappel, la GSK3 β est une enzyme qui phosphoryle TFEB.

Avant d'envisager une étude *in vivo*, j'ai testé ces drogues sur le modèle SH-APP_{swe}. Pour chacune, plusieurs concentrations et différentes cinétiques ont été testées et l'activateur autophagique Smer28 a été utilisé comme contrôle positif, puisqu'il permet une forte réduction des niveaux de C99 et C83 (LAURITZEN et al., 2016 ; TIAN et al., 2011) et une forte translocation du TFEB (Figure 6.3). Malheureusement aucune de ces drogues n'a montré une réduction des niveaux de C99 et de C83 dans ce modèle, certaines d'entre elles induisent au contraire une augmentation des niveaux protéiques du C99 notamment le 2-HP β -CD et le trehalose, malgré une bonne translocation du TFEB avec le HP β CD (Figure 6.3). La translocation du TFEB n'a pas été testée avec le trehalose. L'absence d'effet pour le Tideglusibe et le Temsirolimus sur les niveaux protéiques de C99 est en accord avec les analyses immunocytochimiques, ne montrant pas une meilleure translocation du TFEB lors du traitement avec ces drogues (Figure 6.3).

Plusieurs hypothèses peuvent expliquer le manque d'effet de ces drogues sur l'accumulation de C99 ou un effet opposé, par rapport à ce qui a été décrit dans la littérature. Un point important à garder à l'esprit est la nature même du C99, une protéine transmembranaire, contrairement à l'A β qui est soluble. Tout d'abord, les résultats obtenus avec le HP β CD ont révélé des résultats contradictoires. En effet, nos expériences confirment une meilleure translocation nucléaire du TFEB induite par cette drogue, mais les taux de C99 sont augmentés. Au moment de ces études, un travail publié par l'équipe du Dr Nixon permet d'apporter des éléments de réponse. En effet, le HP β CD a montré un double effet selon la durée de traitement. Dans un premier temps, elle permet d'activer le système lysosomal-autophagique, mais à plus long-terme, elle bloque la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, conduisant à l'accumulation anormale d'autophagosomes immatures et

non-dégradé (D.-S. YANG et al., 2017). Cette double action explique sûrement nos résultats *a priori* contradictoires. De la même façon, les études sur le Trehalose révèlent des effets controversés. En effet, plusieurs études ont montré la capacité de cette drogue à réduire l'accumulation de protéines agrégées, comme les agrégats de l' α -synucléine, de PolyQ ou encore d'A β . Une amélioration des performances cognitives, induite par cette drogue a même été démontrée dans un modèle de souris Alzheimer (J. DU et al., 2013). Cependant, une étude très récente démontre également que le traitement au Trehalose affecte la distribution subcellulaire et/ou le transport de l'APP et des APP-CTFs vers les endosomes tardifs et les lysosomes (TIEN et al., 2016). Dans ce cas, une baisse de la dégradation endolysosomale des APP-CTF, de l'activité des cathepsines et de la voie autophagique sont observées, ce qui est en accord avec nos résultats. Dans le cas du Tideglusibe, l'absence d'effet sur la translocation du TFEB peut s'expliquer par le fait que la GSK3 β n'est pas la kinase majoritaire pour la phosphorylation du TFEB et donc son inhibition n'affecte qu'une petite partie du TFEB dans la cellule, ce qui n'est pas suffisant pour induire des effets notoires dans ce modèle. Au contraire, la GSK3 β est impliquée dans la phosphorylation d'un grand nombre de protéines, dont la protéine Tau, son inhibition pourrait donc entraîner des effets délétères importants. Enfin, l'absence d'effet observée avec le Temsirolimus, qui est un activateur de la rapamycine, pourrait s'expliquer par le fait que le TFEB est insensible à la rapamycine, comme démontré par plusieurs équipes.

En conclusion, ces drogues ne semblent donc pas adaptées pour nos expériences *in vivo*. De plus ces expériences mettent en évidence la difficulté à avoir une drogue spécifique pour activer l'autophagie mais aussi le TFEB. Cet aspect sera abordé dans la partie [IV Discussion et perspectives](#)

6.5 Objectif 5 – Fonction du TFEB dans la MA

Étude de la fonction du TFEB dans le contexte de la MA : étude transcriptionnelle chez des souris 3xTgAD et analyse immunohistochimique sur cerveaux de patients Alzheimer

Comme présenté dans l'introduction, les résultats concernant la régulation du système lysosomal-autophagique dans la maladie d'Alzheimer sont controversés, des études montrant une activation et d'autres une inhibition. Ces différences

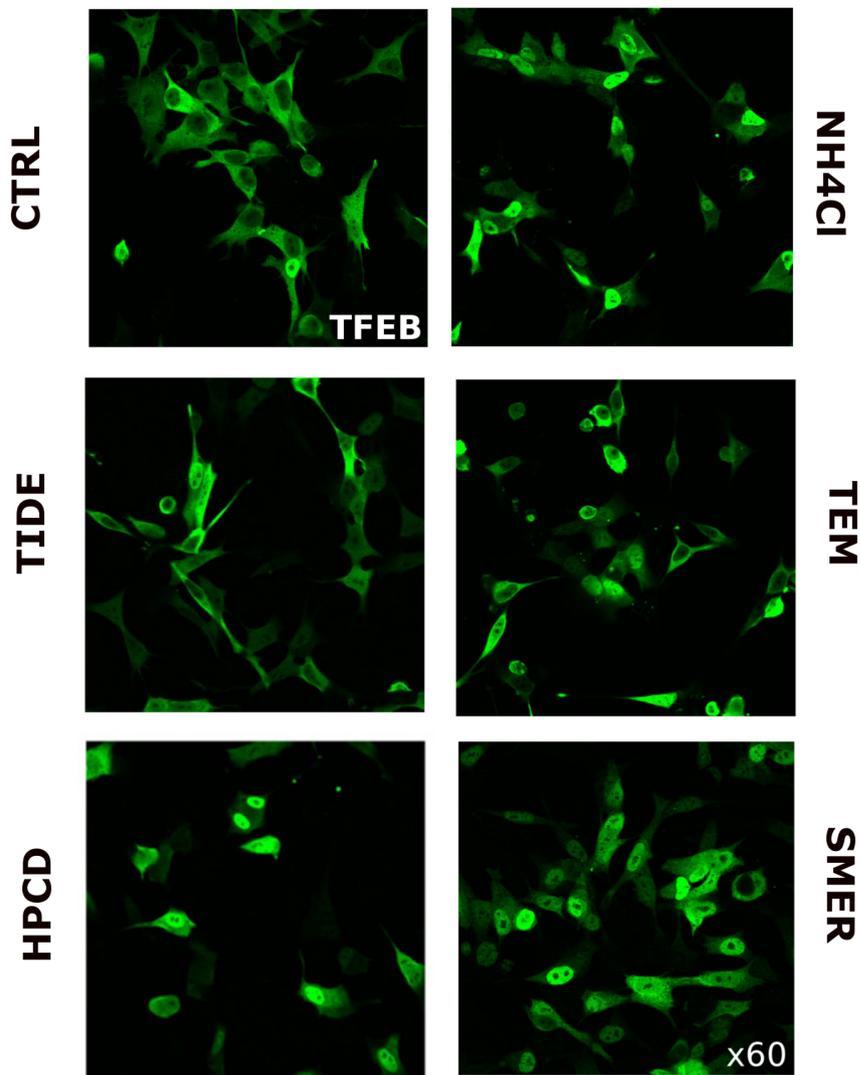


Figure 6.3.: Taux de translocation du TFEB après différents traitements décrits dans la littérature comme activant le TFEB

Étude de la localisation subcellulaire du TFEB dans les cellules SH-APPswe ayant été traitées avec différentes drogues décrites dans la littérature comme activant le TFEB. Les drogues testées sont le Tideglusibe (TIDE), NH₄Cl, le Temsirilus (TEM), l'HPCD ou Smer28 (SMER) ou des cellules non-traitées (CTRL). Les images montrent des exemples représentatifs de chaque traitement. Aucun effet significatif sur la translocation de TFEB n'a été observé pour Le Tideglusibe et le Temsirrolimus.

peuvent s'expliquer par les techniques employées, le stade de la pathologie ou les aires cérébrales analysés. J'ai donc étudié dans deux modèles murins associés à la maladie d'Alzheimer, l'expression des gènes lysosomaux-autophagiques par qPCR. De plus, j'ai réalisé l'expression de TFEB sur coupes de cerveau de patients Alzheimer par analyse immunohistochimique. Ces résultats sont préliminaires et restent à être confirmés.

6.5.1 Caractérisation du système L-A chez les souris 3xTg-AD

Comparaison des souris 3xTg-WT vs 3xTg-AD Les études réalisées auparavant au laboratoire montre un dysfonctionnement du système lysosomal-autophagique chez des souris 3xTg-AD. Pour compléter ces études et afin de déterminer si dans ce modèle le TFEB est fonctionnel, j'ai réalisé une étude d'analyse transcriptionnelle par qPCR de plusieurs gènes lysosomaux et autophagiques dans des fractions hippocampales des souris 3xTg-AD âgées de 4 (Figure 6.4 A) ou 13 mois (Figure 6.4 B), en comparaison avec des souris sauvages 3xTg-WT, après microdissection de l'hippocampe (région où est localisée la pathologie dans ce modèle).

Ces résultats montrent une augmentation des ARN messagers de TFEB lui-même et de plusieurs gènes lysosomaux et autophagique chez les souris 3xTg-AD, et notamment des *CTSD* et *CTSB*, uniquement à 12 mois (Figure 6.4 B). Ceci suggère que dans le modèle 3xTg-AD, le système lysosomal-autophagique est bien dérégulé, mais plutôt en faveur d'une suractivation, ce qui est en accord avec la localisation nucléaire de TFEB dans cette structure suggérant un TFEB actif (Article 1). Ces résultats ne semblent donc pas indiquer un dysfonctionnement inactivateur du TFEB chez ce modèle. L'absence de régulation à 4 mois peut signifier deux choses : (1) soit les niveaux d'ARNm ne sont pas altérés à un stade précoce et confirment une pathologie EAL progressive, bien que des défauts de l'activité lysosomale soient avérés très précocément, (2) soit à nouveau nous sommes confrontés à une dilution de l'effet dans l'hypothèse où le dysfonctionnement est très localisé au sein même de l'hippocampe (dans des types cellulaires bien particuliers ? dans des neurones bien spécifiques?).

Pour confirmer ces résultats, il serait intéressant d'étudier la localisation subcellulaire du TFEB spécifiquement dans les neurones du subiculum des souris 3xTg-AD. De plus, à 13 mois, il est impossible dans ce modèle de discriminer la contribution

du C99 et de l'A β . Une étude similaire dans le modèle 2xTg-AD, présentant la même accumulation de C99 mais des niveaux faibles d'A β , pourrait nous renseigner sur l'implication du C99 dans cette dérégulation. Des analyses similaires sont également en cours dans les souris AAV10-C99.

D'autre part, il a également été surprenant de constater que la localisation sub-cellulaire du TFEB est identique dans les souris 3xTg-AD et les souris 3xTg-WT suite à l'infection virale avec l'AAV8-TFEB, à savoir majoritairement nucléaire. Ceci est en opposition avec les résultats obtenus *in vitro*, montrant une augmentation du taux de translocation dans les SH-APP_{swe} en comparaison avec les SH-naïves. Les résultats dans les souris suggèrent donc une activation "basale" du TFEB lors de la transduction des AAV8-TFEB, mais je n'ai pour le moment pas d'explication permettant de justifier la différence avec le comportement *in vitro*.

Comparaison de différentes aires cérébrales Cette analyse préliminaire avait pour but de déterminer si l'hippocampe pourrait être une structure plus vulnérable aux dérégulations lysosomales-autophagiques, pouvant expliquer l'accumulation du C99 (et de l'A β) spécifiquement dans cette région. Elle a été réalisée sur des souris 3xTg-AD âgées de 13 mois et a consisté à comparer l'hippocampe, le cortex et les aires restantes. De façon intéressante, nous avons observé que les niveaux d'ARNm du TFEB sont largement augmentés dans les aires non-associées à la maladie d'Alzheimer (partie restante) en comparaison avec l'hippocampe ou le cortex (Figure 6.4 C et D, respectivement). Cette augmentation de l'expression génique du TFEB est accompagnée d'une augmentation de l'expression de ses cibles lysosomales (cat B, D et LAMP-1) après normalisation avec un gène de ménage (Figure 6.4 C) ou avec un marqueur neuronal (Figure 6.4 D). Le cortex présente le même profil d'expression que l'hippocampe.

Pour finir, l'expression de ces mêmes gènes est également réduite dans l'hippocampe des souris 3xTg-WT en comparaison avec la partie restante, suggérant que l'hippocampe pourrait être plus vulnérable à des perturbations du système lysosomal-autophagique en raison d'un niveau d'expression basale de ces gènes plus faible. Pour compléter ces résultats, une comparaison de l'activité des enzymes lysosomales, comme la cathepsine B entre ces différentes aires semble indispensable pour tirer des conclusions claires.

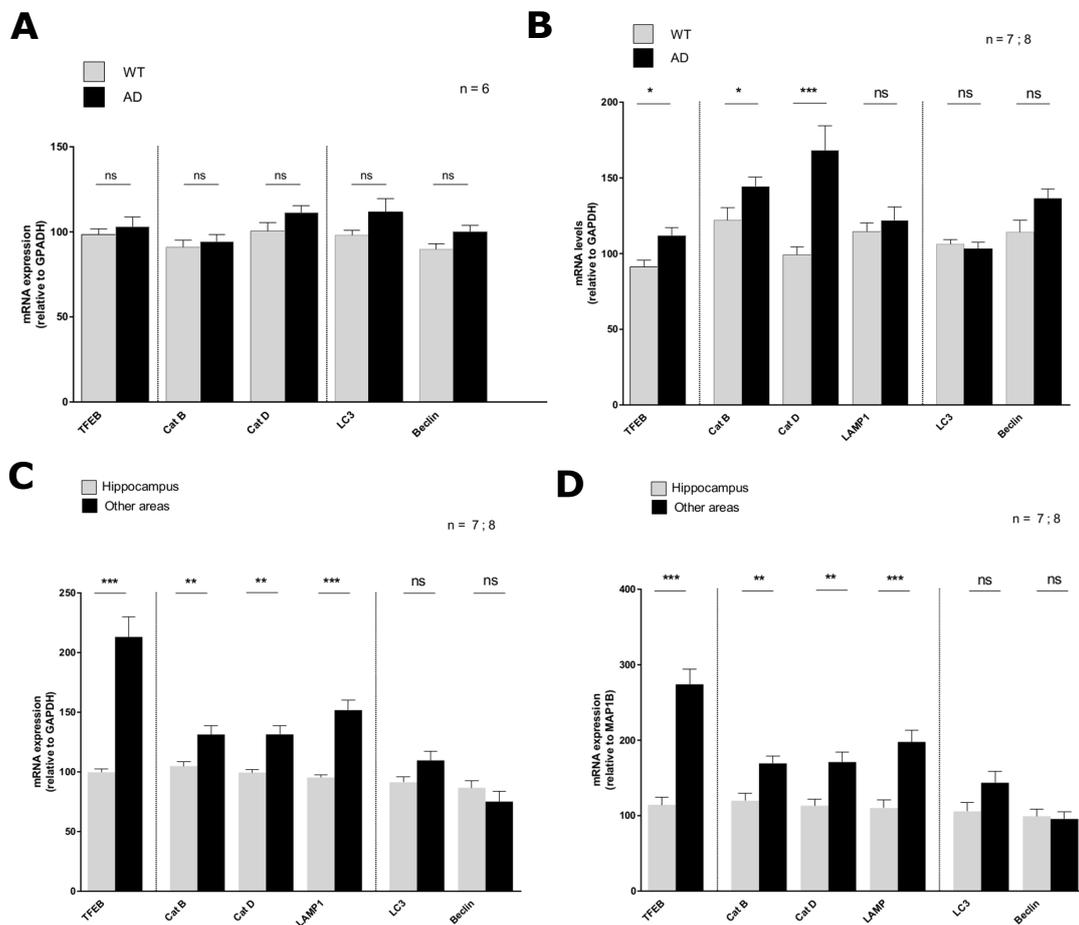


Figure 6.4.: Régulation des gènes lysosomaux et autophagiques chez les souris 3xTg-AD

(A et B) Expression du TFEB et des gènes lysosomaux et autophagiques dans l'hippocampe de souris 3xTg-AD en comparaison avec les souris 3xTg-WT (A) à l'âge de 4 mois (B) à l'âge de 12 mois. (C et D) Comparaison de l'expression du TFEB et des gènes lysosomaux dans deux aires différentes du cerveau : l'hippocampe versus le reste du cerveau (other areas). L'expression a été normalisée par rapport (C) au gène de ménage GAPDH ou (D) au gène codant pour le marqueur neuronale MAP1B. On observe une expression beaucoup moins importante de l'ensemble des ces gènes dans l'hippocampe en comparaison avec « les autres aires ».

6.5.2 Caractérisation du système L-A dans le cerveaux de patients Alzheimer

Dans cette partie, nous avons réalisé une étude immunohistochimique sur des coupes transversales du cortex cérébral de patients Alzheimer (qui est un don du Dr Charles Duyckaerts, Paris et font partie d'une banque de cerveaux répertoriés) et comparé la localisation du TFEB ainsi que l'expression de la cathepsine D, en fonction du marquage amyloïde (réalisé avec l'anticorps anti-agrégats NU1) ou en fonction du stade de la maladie : précoce (Braak II) ou tardif (Braak VI), défini suivant la propagation des dégénérescences neurofibrillaires.

Les analyses immunohistochimiques sur des coupes de patients au stade Braak IV montrent que des plaques amyloïdes (détectées avec NU1) sont retrouvées en grande quantité dans différentes aires du cortex mais sont quasi absentes dans la région hippocampique (**Figure 6.5 A**). Quant au marquage de TFEB, nous observons une différence importante en fonction de la charge amyloïde : dans les zones où le marquage Nu1 est abondant, le TFEB est majoritairement localisé dans le noyau (**Figure 6.5 A, 1 et 2**), par opposition à l'hippocampe où il est principalement cytosolique (**Figure 6.5 A, 3**). Un co-marquage avec les deux anticorps permet d'aboutir aux mêmes résultats. De la même manière, sur des coupes de cerveaux de patients au stade Braak II, présentant un marquage très faible pour NU1, la localisation de TFEB est majoritairement cytosolique. (**Figure 6.5 B**)

Dans un deuxième temps, l'utilisation de l'anticorps anti-cathepsine D a permis de révéler deux marquages différents dans le cortex dépendant de la zone analysée : un marquage extracellulaire formant des plaques de cat D et un marquage intracellulaire classique. De façon intrigante, le marquage sous forme de plaques est associé à des aires peu abondantes en plaques amyloïdes (**Figure 6.6 bas**). En accord avec la littérature, l'expression de la cathepsine D semble plus faible dans les cerveaux de patients de stade II que chez des patients de stade IV. Ce marquage se démarque également par l'absence de marquage de la cat D sous forme de plaques (**Figure 6.6 40x**). Ces résultats sont préliminaires et doivent être confirmés par la quantification d'un plus grand nombre d'individus. Néanmoins, ils ne semblent pas en faveur d'une rétention cytoplasmique du TFEB chez les sujets Alzheimer. Au contraire, chez ces patients, dans les aires présentant une pathologie amyloïde sévère, le TFEB est majoritairement nucléaire. Ces résultats semblent donc en accord avec les observations réalisées par le Dr Bordi montrant une suractivation de l'autophagie

dans un contexte Alzheimer (BORDI et al., 2016). En tout cas, ça ne semble pas être lié à un défaut de translocation dans le noyau.

En conclusion, l'étude du modèle 3xTg-AD et des cerveaux de patients Alzheimer permet de confirmer le dysfonctionnement progressif du système lysosomal au cours de la maladie, qui se traduit par une augmentation de l'expression hippocampique des gènes TFEB et des cathepsines chez la souris et par une forte translocation du TFEB dans les zones abondantes en plaques séniles chez les patients.

6.6 Contribution au projet

J'ai réalisé l'ensemble des expériences de ce projet, que ce soit *in vitro* ou *in vivo* (transfections, immunocytochimies, immunohistochimies, microscopie confocale, extractions ARNm à partir d'homogénat de cellules ou de cerveaux, qPCR, immunoempreintes, injections stéréotaxiques, clonage et productions des virus AAV10-TFEB, expérimentation animale — accouplement, sevrage, suivi —, analyses comportementales — actimétrie, test de la piscine de Morris, test du Barnes Maze —, perfusions intracardiaques). Pour les injections en ICV, j'ai été aidée par Dr Raphaëlle Pardossi-Piquard.

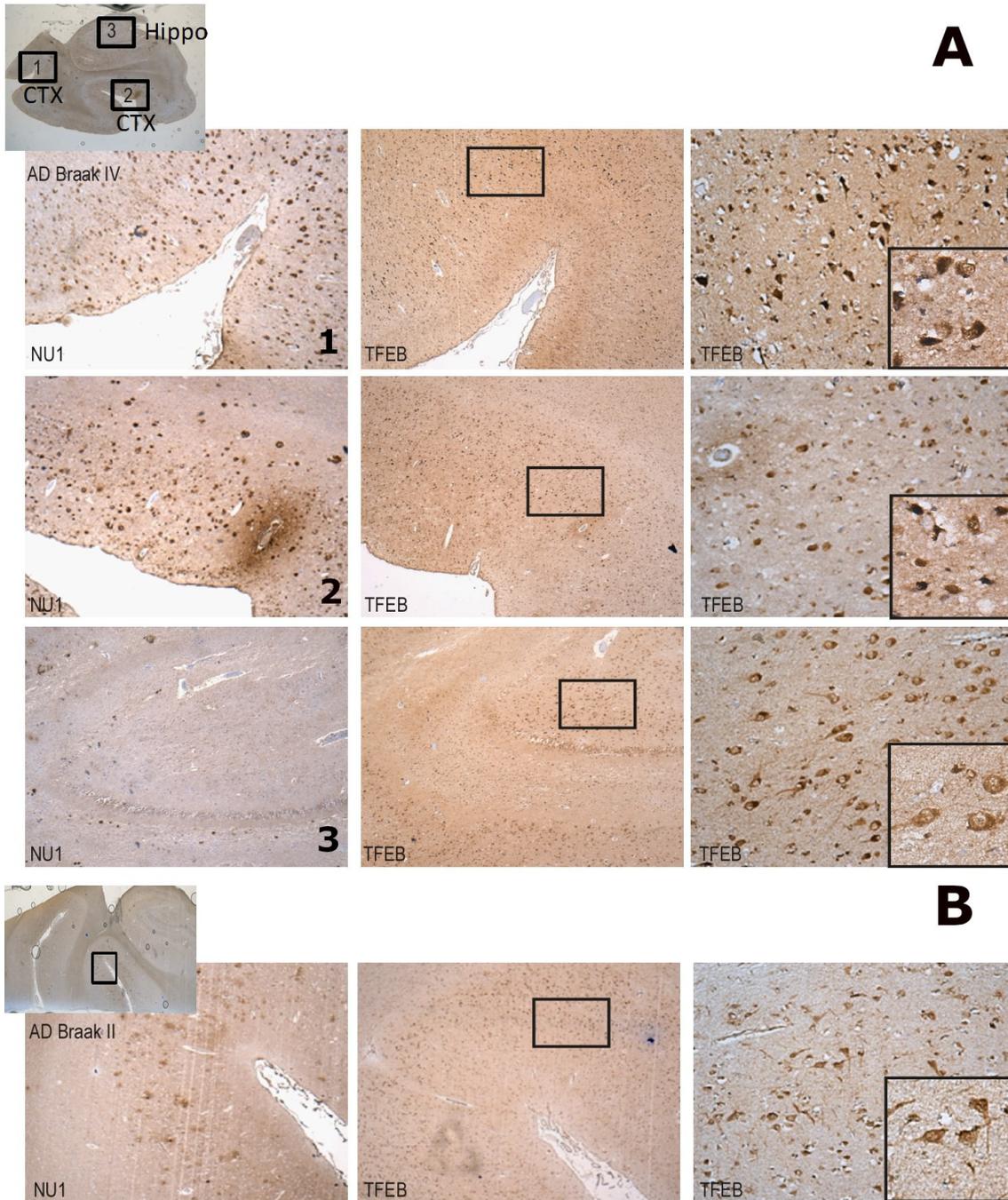


Figure 6.5.: Localisation subcellulaire du TFEB sur coupes de cerveaux humains Alzheimer.

Images montrant des exemples de marquage de NU1 (anti-aggrégat) et du TFEB obtenus par marquage enzymatique (HRP/DAB) dans différentes aires du cerveau d'un patient Alzheimer de stade de Braak IV (A) ou de Braak II (B). (A) Chez le patient Braak IV, on observe la présence de plaques dans les aires corticales et l'absence de ces plaques dans l'hippocampe. Sur des coupes adjacentes, on révèle le marquage du TFEB à faible ou à plus fort grossissement. Les images illustrent une localisation plutôt nucléaire de TFEB dans les aires corticales, alors que sa localisation est plus cytoplasmique dans l'hippocampe. (B) Chez le patient de Braak II, il n'y pas de plaques séniles ni au niveau du cortex, ni au niveau de l'hippocampe. Chez ce patient, le marquage pour le TFEB est cytoplasmique.

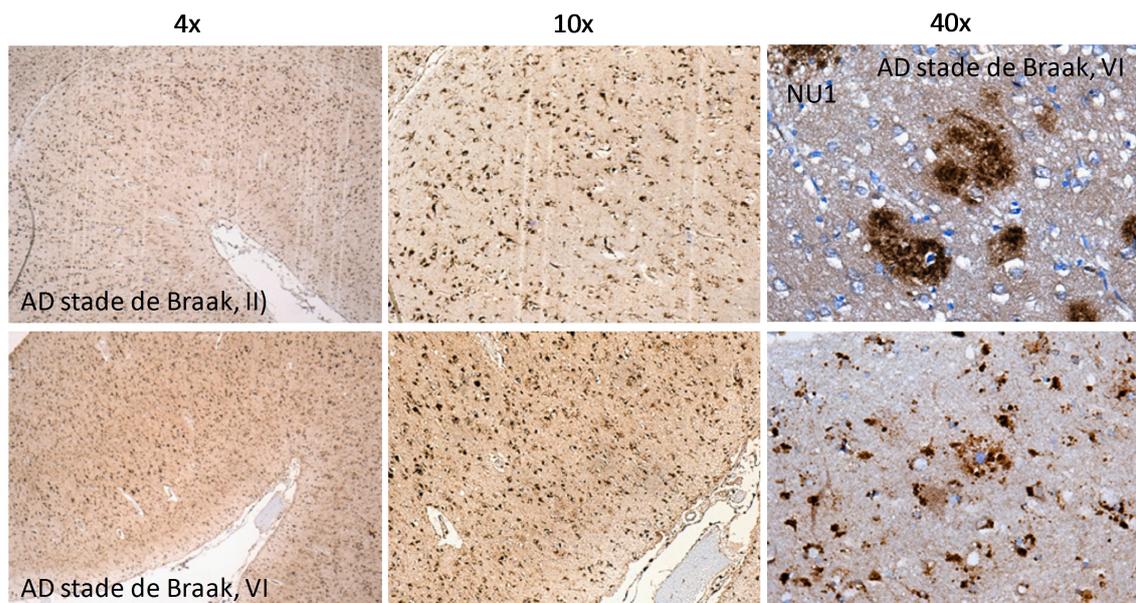


Figure 6.6.: Profil immunohistochimique de la cathepsine D sur coupes de cerveaux humains Alzheimer

Images montrant l'expression de la cathepsine D révélée après marquage enzymatique (HRP/DAB) sur des coupes de cerveau d'un patients Alzheimer de stade de Braak IV ou de Braak II (grossissements 4x ou 10x). Nous observons un plus fort marquage de la cathepsine D chez les patients de Braak IV que chez le patient de Braak II. De plus, nous observons chez le patient de stade Braak IV une expression à la fois intracellulaire et extracellulaire de la cathepsine D (grossissement 40x).

Troisième partie

Les exosomes : un rôle dans la
maladie d'Alzheimer ?

Généralités sur les exosomes

” *The real major bottleneck in the field is not so much to detect Alzheimer’s, which we can do reasonably well once it has progressed, but to detect the earliest signs of the disease.*

— **Ralph Nixon**
NYU

Bien que les pathologies amyloïde et Tau ne débutent pas dans les mêmes aires cérébrales dans la maladie d’Alzheimer, ces deux lésions se propagent avec le temps, jusqu’à envahir la quasi-totalité du cerveau. Cette propagation de protéines toxiques est une caractéristique commune à plusieurs maladies neurodégénératives. Les scientifiques ont donc cherché à comprendre le ou les mécanismes responsables de cette progression spatiale des lésions, dans le but ultime de l’éviter. Une nouvelle piste est apparue grâce à une meilleure caractérisation des vésicules extracellulaires sécrétées par les neurones, et notamment les vésicules appelées exosomes.

7.1 La biogenèse des exosomes

La sécrétion de vésicules extracellulaires (VE) est un mécanisme commun aux cellules procaryotes et eucaryotes et extrêmement conservé au cours de l'évolution. Les VE regroupent un ensemble hétérogène d'entités dérivées de la membrane plasmique et sécrétées par les cellules. Elles peuvent être classées en 2 catégories différentes en fonction de leur origine : les microvésicules, issues du bourgeonnement direct de la membrane plasmique (ectosomes, corps apoptotiques...), et les exosomes, d'origine endosomale. Ces derniers sont les VE les plus étudiées à ce jour. L'équipe du Dr Harding fut la première à observer ces vésicules dans les années 80, grâce à des analyses de microscopie électronique sur des réticulocytes de mouton. Ces images montraient l'exocytose de nanovésicules produites en intracellulaire et initialement renfermées dans des vésicules plus larges, identifiées plus tard comme les corps multivésiculaires (MVB) — pour "multivesicular body" — (HARDING et al., 1983). Cependant, le terme « exosome » n'est apparu que 4 années plus tard grâce au Dr Johnson, qui définit de façon plus claire cette catégorie de vésicules extracellulaires (JOHNSTONE et al., 1987).

7.1.1 Origine

Les MVBs sont des intermédiaires entre les endosomes précoces et les endosomes tardifs (voir 4.2.2 Voie endosomale). Au cours de la maturation des MVBs, la membrane endosomale s'invagine et donne naissance à des vésicules de l'ordre de 100 nm, s'accumulant dans la lumière des MVBs et appelées vésicules intraluminales (ILV) — pour "intra-luminal vesicle" —. Ces ILVs contiennent des cargos membranaires provenant des endosomes précoces ainsi que des cargos cytoplasmiques, piégés lors de l'invagination. Après maturation, les MVBs peuvent être adressés soit aux lysosomes, où les ILVs et leur contenu seront dégradés, soit à la membrane plasmique, où les ILVs seront libérées dans l'espace extracellulaire. **Les ILVs sécrétées par la cellule sont appelées exosomes.** Les MVBs destinés à la dégradation ou à la membrane plasmique semblent se distinguer par la composition lipidique et protéique de leur membrane. En effet, les MVB riches en sphingolipides, cholestérol, céramides et protéines appartenant à la famille des tétraspanines seraient préférentiellement destinés à la membrane plasmique alors que ceux enrichis en lipides de

type LBPA — pour "LysoBiPhosphate Acid" — et pauvres en cholestérol seraient envoyés vers les lysosomes.

7.1.2 Mécanisme

La sécrétion des exosomes est un mécanisme plutôt bien décrit dans la littérature, impliquant 3 acteurs principaux : la machinerie ESCRT, les tétraspanines et les céramides. La machinerie ESCRT — pour "Endosomal Sorting Complexes Required for Transport" — est composée de 4 complexes cytosoliques (ESCRT-0 à -III), participant au tri des protéines. Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires s'assemblant entre elles ou avec d'autres protéines (intégrines, les immunoglobulines. . .) pour former un réseau d'interaction moléculaire. Enfin, les céramides sont des lipides produits lors de l'hydrolyse de la sphingomyéline par la sphingomyélinase de type II (**nSMase 2**). La sécrétion exosomale s'effectue en 3 étapes majeures : la biogenèse des ILVs, le transport des MVBs vers la membrane plasmique et leur fusion (voir **Figure 7.1 A**).

Biogenèse des ILVs La biogenèse des ILVs commence par une réorganisation de la membrane du MVB et la formation d'un micro-domaine lipidique, permettant de concentrer le cargo transmembranaire. Cette étape s'effectue suivant un mécanisme dépendant ou indépendant de la machinerie ESCRT et conduit à la courbure négative de la membrane. Dans le premier cas (voie dépendante d'ESCRT), le cargo ubiquitinylé est reconnu par le complexe ESCRT-0, qui est stabilisé à la membrane grâce à son interaction avec le PI3P. Ce complexe permet ensuite le recrutement successif du complexe ESCRT-I contenant la protéine Tsg101 — pour "Tumor Susceptibility Gene 101" — et du complexe ESCRT-II. L'accumulation des complexes ESCRT-I et -II au niveau de la membrane entraîne sa courbure et la séquestration du cargo. Dans le deuxième cas (voie indépendante des ESCRT), cette courbure est induite spontanément suite à l'accumulation de céramides, produits à partir des sphingomyélines concentrées dans les radeaux lipidiques. D'ailleurs, l'inhibition de la nSMase, enzyme responsable de la formation de céramide à partir de la sphingomyéline, avec le GW4859, bloque ainsi la production et la sécrétion exosomale. Cette dernière voie est également régulée par les tétraspanines (notamment CD63) et semble être spécifique des MVBs destinés à la membrane plasmique. La formation de ces micro-domaines permet également de recruter des

cargos cytosoliques (ARN, protéines...), qui seront internalisés dans les ILVs. Dans les deux cas, l'étape finale pour la formation des ILVs implique le recrutement du complexe ESCRT-III, qui permet la scission de la vésicule nouvellement formée et sa libération dans la lumière des MVBs. Ce recrutement s'effectue soit par liaison directe de ESCRT-III avec ESCRT-I ou par l'intermédiaire des protéines synténine-Alix — pour "ALG-2-Interacting protein X" —, qui créent un pont entre le cargo et le complexe ESCRT-III (voir **Figure 7.1 B**). La contribution de ces voies dans le devenir des exosomes est encore controversée, certains suggèrent que ces deux voies participeraient à la biogenèse des exosomes et leur contribution respective dépendrait du type cellulaire et du cargo (modifications post-transcriptionnelles par exemple), alors que d'autres suggèrent que les ILVs produites *via* la voie ESCRT dépendante seraient destinées à la voie lysosomale alors que celles produites *via* la voie ESCRT indépendante seraient destinées à la sécrétion d'exosomes. Il en résulte que plusieurs populations de MVBs sont retrouvées au sein d'une même cellule ou entre deux types cellulaires différents et donc révèlent potentiellement l'existence de sous-populations d'exosomes (BAIETTI et al., 2012).

Transport et fusion des MVBs Une fois les ILVs formées, leur sécrétion nécessite dans un premier temps l'adressage et le transport des MVBs vers la membrane plasmique. S'en suit une étape d'ancrage à la membrane permettant *in fine* la fusion des MVBs avec la membrane plasmique, permettant la libération des exosomes. Le transport des MVBs requiert leur interaction avec le cytosquelette d'actine et de microtubules *via* des moteurs cellulaires tels que les kinésines. Les GTPases Rab participent également à la régulation de ce mécanisme. Plusieurs d'entre elles ont été décrites en fonction du type cellulaire, avec un rôle prépondérant de Rab27, Rab11 et Rab35. L'équipe du Dr Tery a notamment mis en évidence que l'isoforme Rab27B serait impliquée dans le transport et l'ancrage des MVBs à la membrane plasmique alors que Rab27A serait plus spécifique de l'ancrage (OSTROWSKI et al., 2010). Enfin, les acteurs moléculaires impliqués dans la fusion des MVBs avec la membrane plasmique ne sont pas clairement définis, mais inclus probablement des protéines SNARE (vSNARE à la surface des MVBs et tSNARE à la membrane plasmique) et des synaptotagmines. **L'enchaînement de ces mécanismes conduit à la sécrétion d'exosomes, qui se retrouvent dans le milieu extracellulaire et rejoignent les fluides biologiques comme le sang, le LCR ou les urines.**

Fixation des exosomes sur cellule réceptrice Les exosomes peuvent également atteindre une cellule réceptrice et entraîner soit (1) une signalisation intracellulaire induite par une interaction d'un ligand exosomal avec un récepteur membranaire, soit (2) la libération de leur contenu dans le cytoplasme de la cellule cible par fusion directe avec la membrane plasmique soit (3) une internalisation de la vésicule entière *via* différents types d'endocytose. Par exemple, les neurones internalisent les exosomes majoritairement par la voie dépendante des clathérines ou par phagocytose alors que leur internalisation a lieu par macropinocytose dans les microglies. Ces exosomes internalisés rejoindront la voie endosomale. Ces propriétés confèrent aux exosomes des rôles physiologiques mais également pathologiques (voir [7.3.2 Rôles pathologiques](#)).

Les revues suivantes ont également servi à la rédaction de cette partie : KALRA et al., 2016 ; MELDOLESI, 2018 ; van NIEL et al., 2018 ; SORIA et al., 2017.

7.1.3 Composition

De par leur origine, la composition protéique et lipidique des exosomes est proche de celles des endosomes. Néanmoins elle diffère selon les types cellulaires. Le but de cette partie n'est pas de faire un catalogue de l'ensemble de ces molécules, dont une partie est citée dans la [Figure 7.2](#) (THÉRY et al., 2009 ; COLOMBO et al., 2014), mais de préciser celles qui permettent de distinguer les exosomes des autres vésicules extracellulaires, servant ainsi de marqueurs. Tout d'abord, les exosomes sont entourés d'une bicouche lipidique enrichie en cholestérol et en sphingolipides (céramides et sphingomyéline) et contenant des radeaux lipidiques. Certaines de ces protéines spécifiques des radeaux lipidiques sont les flotilines 1 et 2, enrichies dans les exosomes. De plus, ils contiennent également certaines protéines de la famille des tétraspanines comme CD63, des protéines associées aux complexes ESCRT comme Tsg101 ou Alix et des protéines chaperonnes comme Hsp 70. Enfin, la lumière des exosomes peut également renfermer des acides nucléiques comme les ARNm ou les miARN, des enzymes ou des métabolites, qui sont internalisés lors de la formation des ILVs. Pour plus d'informations, la majorité des résultats relatifs à la caractérisation du contenu des exosomes a été rassemblée dans différentes bases de données : Exocarta, Evpedia ou Vesiclepedia (MATHIVANAN et SIMPSON, 2009 ; KALRA et al., 2012 ; SIMPSON et al., 2012 ; D.-K. KIM et al., 2013). En particulier, les exosomes neuronaux sont positifs pour les protéines Alix, Tsg101 et flotiline,

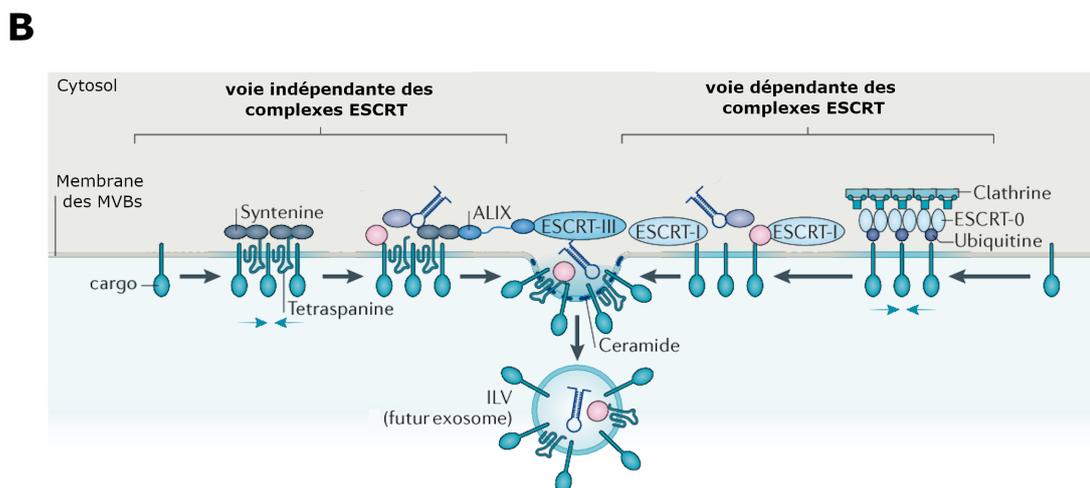
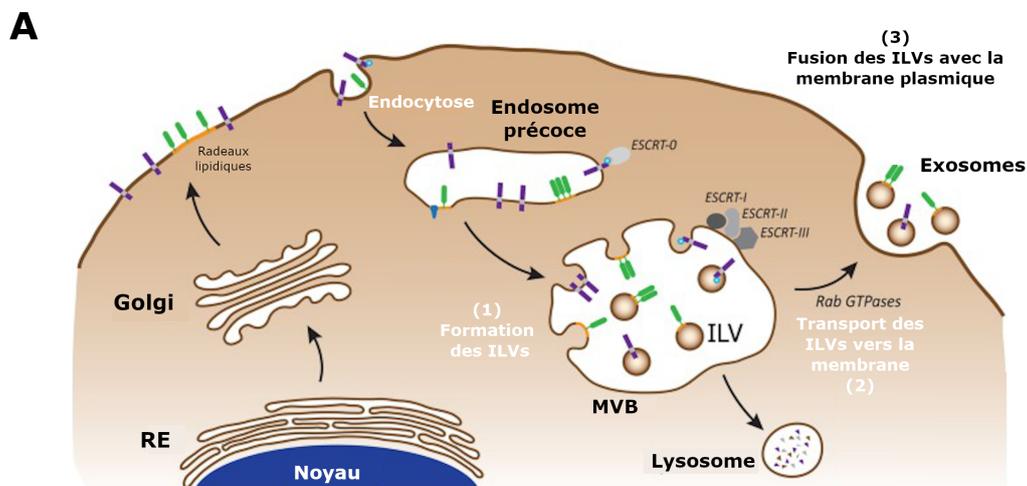


Figure 7.1.: Biogenèse des exosomes

(A) Schéma simplifié de la biogenèse des exosomes. Trois étapes principales conduisent à la sécrétion des exosomes : (1) la formation des vésicules intraluminales (ILVs) dans les MVBs, (2) le transport des MVBs vers la membrane plasmique (3) la fusion des MVBs avec la membrane plasmique. (B) La formation des ILVs implique le recrutement du complexe ESCRT-III qui peut se faire suivant une voie dépendante (ESCRT-0, -I, -II) ou indépendante des ESCRT. Cette dernière fait intervenir les tétraspanines qui vont permettre de séquestrer les cargos membranaires ou cytoplasmiques et les protéines synténine-Alix vont former un pont entre le cargo et ESCRT-III. (Source : BELLINGHAM et al., 2012 ; van NIEL et al., 2018)

marqueurs qui sont communs à la majorité des exosomes provenant de types cellulaires différents, mais aussi pour des protéines neuronales plus spécifiques comme la molécule d'adhésion L1Cam ou la protéine prion PrP (FAURÉ et al., 2006).

7.2 L'étude des exosomes

L'identification des caractéristiques morphologiques, physiques et biochimiques des exosomes a permis de mettre au point des méthodes d'isolation de ces vésicules à partir de milieu de culture, de fluides biologiques ou de tissus de cerveaux entre autres.

7.2.1 Isolement

Ces méthodes sont basées sur l'isolement en fonction de leur taille (30 à 150 nm), leur masse, leur densité ($d = 1,15$ à $1,19$ g/mL) ou l'expression de marqueurs de surface spécifiques (CD63, CD9, CD81). La technique de référence est basée sur une série d'ultracentrifugations ayant pour but de sédimenter les exosomes, après exclusion des débris cellulaires et des autres VE (étape finale à 100 000g). Ces étapes de centrifugations sont souvent combinées à un gradient de densité qui permet d'augmenter la pureté des préparations. Il existe aussi de nombreux kits commerciaux de purification d'exosomes souvent basés sur une précipitation d'exosomes sans étapes d'ultracentrifugation et incluant ou pas une purification par capture immunomagnétique. De plus, une recherche croissante tente à développer des techniques plus efficaces et permettant surtout des préparations plus pures, comme par exemple la chromatographie d'exclusion par taille (SEC) — pour "Size Exclusion Chromatography" — (THÉRY et al., 2018) (voir [Table 13.11](#)). Dans le cas des maladies neurodégénératives, les exosomes purifiés à partir de LCR peuvent être de bons indicateurs, pouvant refléter des changements au niveau du cerveau, d'où leur intérêt dans la recherche de nouveaux biomarqueurs. Les volumes collectés lors du prélèvement de LCR étant très faibles, il faudra adapter la méthode d'isolement utilisée, par exemple la SEC. Néanmoins, il a été montré que les exosomes contenus dans le LCR ne proviennent pas strictement du cerveau (VELLA et al., 2016). Le Dr Levy a donc soulevé l'importance de regarder ce qu'il se passe directement

dans le cerveau, parfois même dans des régions bien spécifiques. Son équipe a donc mis au point le premier protocole permettant d'isoler les exosomes à partir de tissus cérébraux. Cette méthode est basée sur une dissociation douce du tissu, permettant de récupérer l'espace extracellulaire, suivie des étapes de centrifugation et d'ultracentrifugation et d'un gradient sucrose aboutissant à une fraction enrichie en exosomes (PEREZ-GONZALEZ et al., 2012 ; PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2017). Enfin, il est important de noter que quelque soit la technique d'isolement employée, les échantillons ne sont jamais des fractions pures et contiennent notamment des vésicules autres que les exosomes, d'où l'utilisation le plus souvent dans la littérature du terme plus large de "vésicules extracellulaire" ou de "fraction enrichie exosomes". **Une caractérisation microscopique et biochimique est primordiale pour vérifier la pureté de ces préparations et avant les analyses fonctionnelles des exosomes.**

7.2.2 Caractérisation

Plusieurs méthodes permettent de caractériser la nature des vésicules purifiées et doivent être combinées pour évaluer la pureté de la préparation. Cette caractérisation se fait à nouveau selon la taille et la morphologie des vésicules ainsi que selon l'expression des marqueurs biochimiques cités précédemment. La microscopie électronique à transmission permet d'évaluer à la fois de la taille et la morphologie des vésicules. Les exosomes ont une taille d'environ 30 à 150 nm et ont généralement une forme homogène et ronde, mais le traitement nécessaire à leur observation peut entraîner leur contraction et conduit à une forme bien particulière (« *cup-shaped* »). La taille est mesurée aussi par des techniques de suivie de particules en environnement liquide, comme le NTA — pour "nanoparticle tracking" — ou la DLS — pour "dynamic light scattering" —. Ces deux dernières techniques sont basées sur l'étude du mouvement brownien des particules en suspension et la diffusion de la lumière ; la technique de NTA a l'avantage de renseigner également sur la concentration de l'échantillon analysé. L'étude de l'expression des marqueurs de surface (Tsg101, Alix, CD63, Hsp70, Flotilline 1 et 2) peut se faire par immunoprinte. Ces analyses basiques peuvent être complétées par exemple par des analyses protéomique ou lipidomique qui permettent de renseigner sur un vaste nombre de protéines et lipides, respectivement.

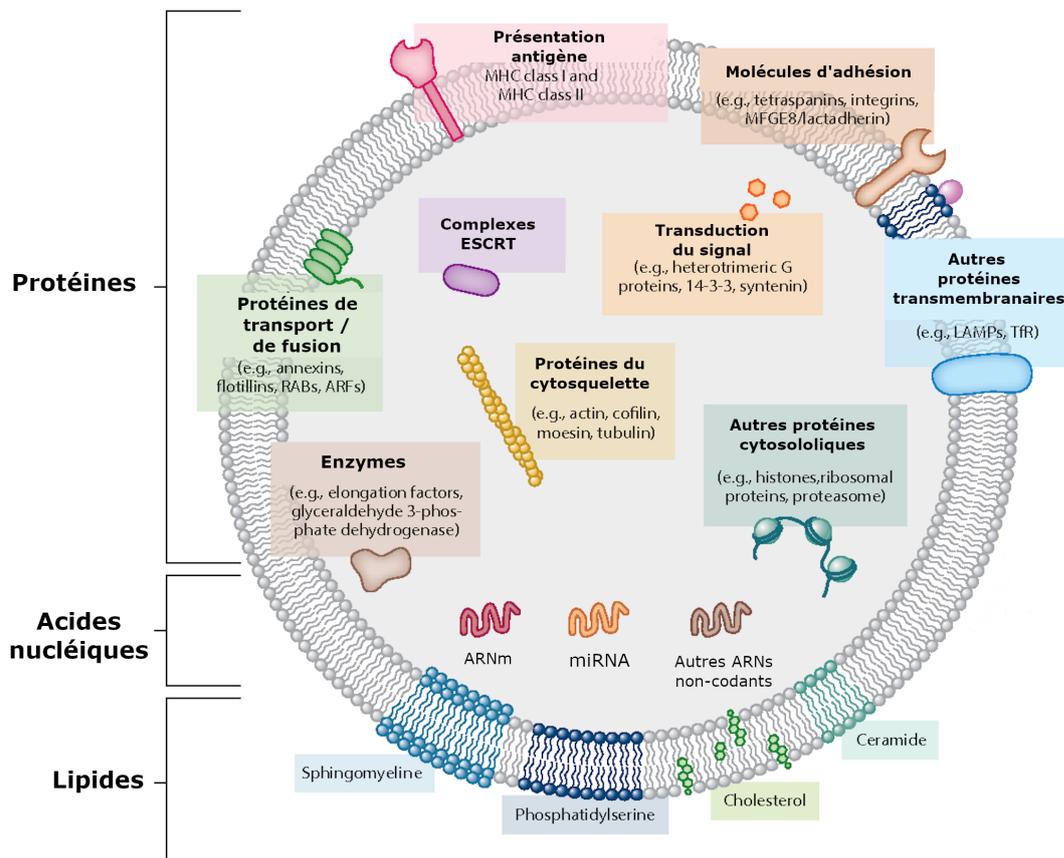


Figure 7.2.: Composition des exosomes

Les exosomes contiennent à la membrane et dans leur lumière un grand nombre de protéines, lipides, acides nucléiques impliqués dans divers mécanismes cellulaires. (Source : COLOMBO et al., 2014)

7.3 Les fonctions physiopathologiques des exosomes

Pendant longtemps, l'unique rôle attribué aux exosomes a été le maintien de l'homéostasie cellulaire, en débarrassant la cellule de ses déchets toxiques (fonction de poubelle). Néanmoins, les travaux du Dr Raposo en 1996 ont permis d'attribuer une nouvelle fonction à ces vésicules.

7.3.1 Communication intercellulaire

Dans ses travaux, le Dr Raposo présente, pour la première fois, les exosomes comme un nouvel acteur de la communication entre les cellules, considérée jusqu'ici comme étant médiée par des contacts directs cellule-cellule ou par des molécules de signalisation solubles (neutransmetteurs ou hormones). En effet, il a été montré que les exosomes libérés par les lymphocytes B contiennent des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMHII), ce qui leur permet de faire de la présentation antigénique et d'induire l'activation des lymphocytes T, participant ainsi à la régulation de la réponse immunitaire (RAPOSO et al., 1996). Cette fonction dans la communication intercellulaire s'est élargie à un grand nombre de types cellulaires et **les exosomes sont aujourd'hui considérés comme un moyen de transporter des molécules biologiques d'une cellule à l'autre, participant ainsi à la communication paracrine ou même endocrine**. De plus, il est bien établi que les exosomes jouent aussi un rôle clé dans le transfert d'ARNm et de microARN (miR) entre les cellules, permettant ainsi un échange génétique (VALADI et al., 2007). Comme décrit précédemment, la fixation de ces exosomes à une cellule réceptrice va permettre une signalisation, spécifique à chaque type cellulaire. Dans le cas du SNC, tous les types cellulaires (neurones, astrocytes, microglies, oligodendrocytes) sont capables de sécréter des exosomes et ces derniers interviennent dans des processus physiologiques tels que l'activité synaptique, la vascularisation ou la régénération neuronale (RAJENDRAN et al., 2014). Alors que la littérature sur les rôles physiologiques des exosomes est assez restreinte, un nombre croissant d'études s'intéresse à leur implication dans des conditions pathologiques.

7.3.2 Rôles pathologiques

Les exosomes ont été impliqués dans deux grandes familles de pathologies caractéristiques de notre époque : les cancers et les maladies neurodégénératives. En effet, dans les cancers, les exosomes ont été montrés comme favorisant la formation de métastases (MELDOLESI, 2018). De façon comparable, dans les maladies neurodégénératives, ils pourraient participer à la propagation spatiale des lésions, en déversant leur contenu dans des cellules « saines ». Cet aspect sera détaillé dans la partie [8 Exosomes et les maladies neurodégénératives](#).

7.3.3 Régulations en condition pathologique

Les mécanismes à l'origine de la régulation de la production et la sécrétion des exosomes sont encore mal connus, mais certains changements cellulaires conduisant à une rupture de l'homéostasie cellulaire favoriseraient cette voie. Par exemple, plusieurs études ont montré qu'un stress cellulaire, hypoxie, stress du RE, augmente la libération d'exosomes. D'autre part, un défaut de la dégradation lysosomale favoriserait la sécrétion d'exosomes, ce mécanisme pouvant être perçu comme un moyen alternatif pour la cellule de se libérer des substrats toxiques (LEVY, 2017 ; EITAN et al., 2016). De la même façon, la sécrétion exosomale serait aussi liée au mécanisme autophagique (BAIXAULI et al., 2014). En effet, les MVBs sont aussi capables de fusionner avec des autophagosomes, ce qui conduit à la formation d'amphisomes. De plus, plusieurs études montrent qu'une inhibition de l'autophagie conduit à une augmentation de la libération d'exosomes (HESSVIK et LLORENTE, 2018). Cette dérégulation conjointe est d'autant plus intéressante qu'il est connu que ces dysfonctionnements endosomaux et autophagiques sont des caractéristiques des maladies neurodégénératives. Ces aspects seront abordés plus en détail dans la [8 Exosomes et les maladies neurodégénératives](#).

La biogenèse des exosomes est un mécanisme complexe, donnant naissance à des sous-populations d'exosomes qui dépendent du type cellulaire et du cargo. De plus, la production et/ou la sécrétion d'exosomes peuvent être dérégulées dans certaines conditions pathologiques.

Exosomes et les maladies neurodégénératives

Bien que plusieurs voies de communication aient été incriminées dans la propagation des maladies neurodégénératives (contact cellule-cellule, « tunnelling nanotubes »), les exosomes semblent jouer un rôle majeur et être une caractéristique commune à ces maladies. La voie exosomale est altérée dans la majorité des maladies neurodégénératives, se traduisant par une modification de leur sécrétion et/ou de leur contenu. Un argument fort de l'implication des exosomes dans la propagation de ces pathologies est la présence systématique dans ces exosomes des protéines toxiques associées à chacun des maladies neurodégénératives, et participant ainsi probablement à la dissémination de la maladie dans le cerveau et même parfois à la périphérie.

8.1 Leur implication dans les maladies à prions

L'idée que la propagation des maladie neurodégénératives pouvait se produire *via* les exosomes est apparue en 2004 avec les travaux du Dr Fevrier, s'intéressant aux maladies à prion.

8.1.1 Maladies à prions

Les maladies à Prion aussi appelées encéphalopathies spongiformes sont des maladies neurodégénératives transmissibles, retrouvées chez l'Homme (maladie de Creutzfeldt-Jakob) et chez l'animal (encéphalopathie spongiformes bovines et scrapie). La particularité de ces maladies est la nature de l'agent infectieux, qui n'est

pas un virus ou une bactérie, mais une protéine : la protéine prion — pour "proteinaceous infectious particle" —. Deux isoformes de la protéine prion sont identifiées dans la maladie : l'isoforme normale appelée (PrPc) — pour "cellule" — et l'isoforme pathologique appelée (PrPsc) — pour "scrapie" —. Alors que la forme normale, majoritairement exprimée dans les neurones, présente des rôles physiologiques, la forme pathologique est elle induite par un changement de conformation de la PrPc qui confère à cette dernière une forte capacité d'agrégation, conduisant à la formation de fibrilles puis à la neurodégénérescence. L'hypothèse de transmission *via* une protéine exclusivement a été spéculée par Griffins (GRIFFITH, 1967) puis démontrée par Prusiner en 1982 (PRUSINER, 1982), ce qui lui valut le prix Nobel de médecine en 1997. Cette hypothèse postule que la protéine PrPsc peut, à elle seule, entraîner une réaction en chaîne, dans laquelle la protéine toxique a la capacité de transmettre la pathologie mais également d'induire un mauvais repliement des protéines PrPc naïves. Cette réaction est à l'origine de la cascade pathologique caractéristique de la maladie. Cette transmission de l'état mal replié a lieu d'une cellule à l'autre mais également d'un individu à l'autre.

8.1.2 Exosomes : vecteur de la maladie

L'implication des exosomes dans la transmission des maladies à prions a été introduite grâce à la mise en évidence de la présence des protéines PrPc et PrPsc dans les exosomes sécrétés par des cellules infectées. Ces protéines ont été les premières protéines « neurodégénératives » à être identifiées dans ces vésicules. La protéine PrPsc a été montrée comme étant attachée à la membrane des exosomes et ces derniers sont donc un des vecteurs de l'infection (FEVRIER et al., 2004). Les exosomes participent à la fois au transport des protéines toxiques mais ils confèrent également un environnement favorable pour la conversion des protéines PrPc en PrPsc. La transmission de la capacité d'agrégation, médiée par les exosomes contenant le PrPsc, a été montrée aussi *in vivo* chez des souris naïves (VELLA et al., 2007). La présence de ces exosomes enrichis en protéine PrPsc dans le LCR de mouton a ensuite été démontrée par le Dr Vella (VELLA et al., 2008). Cette transmission peut également s'effectuer entre différents types cellulaires, permettant d'expliquer la transmission de la maladie de la périphérie (premier site d'infection) vers le SNC. Des études postérieures ont également montré que les exosomes sont la principale voie de sécrétion du PrPsc par les cellules (ARELLANO-ANAYA et al., 2015). Enfin,

la protéine prion elle même peut aussi favoriser la sécrétion d'exosomes, notamment en inhibant la formation des autophagosomes, amplifiant ainsi le caractère infectieux du PrPsc.

8.2 Leur implication dans la maladie d'Alzheimer

Bien que la maladie à prions soit la seule maladie neurodégénérative pour laquelle la transmission entre individus soit avérée, **les autres maladies neurodégénératives présenteraient des caractéristiques de propagation similaires au prion, ce qui a donné naissance au terme « maladies prion-like »**¹. Ce terme décrit des maladies dans lesquelles des protéines toxiques sont capables de se transmettre de cellule en cellule d'un même individu, mais pas d'un individu à l'autre. Les exosomes participeraient à ce phénomène comme le suggère la présence de protéines agrégées caractéristiques de ces maladies dans ces vésicules extracellulaires issues de modèles cellulaires ou animaux : l' α -synucléine (maladie de Parkinson), la protéine huntingtine (maladie de Huntington), la protéine SOD1 (sclérose amyotrophique latérale) ou les protéines A β et Tau (maladie d'Alzheimer) (pour revue : HOWITT et HILL, 2016 ; SORIA et al., 2017). Seules les études sur l'implication des exosomes dans la MA seront détaillées dans ce manuscrit. Toutefois, deux données importantes provenant des études sur la maladie de Parkinson et de Huntington sont à garder à l'esprit : (1) les exosomes purifiés à partir de LCR de patients parkinsoniens favorise l'oligomérisation de l' α -synucléine dans des cellules receveuses naïves (STUENDL et al., 2016) et (2) l'injection d'exosomes purifiés à partir de fibroblastes de patients atteints de la maladie de Huntington, chez des souris nouveaux-nés sauvages, entraîne la propagation de la maladie dans le cerveau et permet de reproduire le phénotype comportemental associé à la maladie (JEON et al., 2016). De la même façon, une propagation « prion-like » a été proposée dans le cas de la maladie d'Alzheimer.

8.2.1 Transmission de la pathologie Tau

Une des caractéristique de la MA est l'hyperphosphorylation de la protéine Tau. La première étude montrant la sécrétion de Tau *via* des exosomes a été publiée par le

1. Maladies dont les agents pathologiques se comportent comme un prion

Dr Saman en 2012. Auparavant, la présence de Tau en extracellulaire était associée principalement à une diffusion passive de la protéine, due à une dégénérescence axonale et la mort neuronale (JACK et al., 2010). L'étude du Dr Saman a permis de mettre en évidence la présence de Tau phosphorylée dans des exosomes purifiées à partir de milieu de culture de neuroblastomes surexprimant la forme sauvage de Tau (4R0N) ou à partir de LCR de patients Alzheimer, dès le stade Braak III (SAMAN et al., 2012). La protéine Tau exosomale est phosphorylée sur plusieurs épitopes, et notamment sur la thréonine 181 dans le LCR des patients, qui est un biomarqueur établi. La sécrétion de Tau *via* des exosomes a été par la suite validée dans plusieurs modèles *in vitro* (Y. WANG et al., 2017) et chez des patients Alzheimer (FIANDACA et al., 2015; Y. WANG et al., 2017; GUIX et al., 2018). Ces observations suggèrent l'implication des exosomes dans la propagation de la pathologie Tau dans la MA. L'étude du Dr Asai vient confirmer cette hypothèse, en montrant qu'une inhibition de la voie exosomale (génétique ou pharmacologique) réduit la propagation de la pathologie Tau *in vitro* et *in vivo* dans un modèle accéléré de la propagation de Tau (H. ASAI et al., 2015). D'autre part, il a été proposé que les microglies, par phagocytose puis exocytose des agrégats de Tau, participent à cette propagation. En effet, l'étude montre que la déplétion des microglies empêche la propagation de Tau dans le cerveau. Ces résultats suggèrent donc que la propagation de Tau se fait *via* les exosomes et les microglies conjointement. Une seconde étude vient renforcer cette idée d'un rôle des exosomes dans la propagation de tau dans un modèle de souris transgénique de Tau (rTg4510). Premièrement, il a été observé que les niveaux de Tau phosphorylée dans les exosomes augmentent en fonction de la sévérité de la pathologie Tau et deuxièmement que les exosomes purifiés des cerveaux de ces souris ont la capacité de propager l'agrégation de Tau dans le cerveau (POLANCO et al., 2016). Cette étude montre également que la protéine Tau est phosphorylée dans les exosomes, mais pas au niveau des épitopes pathologiques, contrairement aux observations de Saman et collaborateurs. De plus, des travaux plus récents de la même équipe montrent, grâce à un système de culture microfluidique de neurones d'hippocampe, que certains exosomes peuvent être transmis d'un neurone à un autre neurone sans passer par une étape d'internalisation (POLANCO et al., 2018). Ces exosomes ne passent donc pas par la voie d'endocytose et ne sont pas dégradés. L'ensemble de ces données propose un rôle central des exosomes dans la propagation de la pathologie Tau dans la MA.

8.2.2 Premières études sur l'A β et les APP-CTFs

Présence dans les exosomes La première étude révélant la présence d'A β dans les exosomes a été réalisée par l'équipe du Dr Rajendran en 2006. En effet, cette étude, ayant pour but initial d'étudier la localisation intracellulaire du clivage de l'APP par la β -sécrétase, a révélé la présence de l'A β dans les exosomes. Ces travaux montrent également, par étude immunohistologique sur coupes de cerveaux de patients Alzheimer, l'enrichissement de protéines exosomales dans les plaques amyloïdes suggérant pour la première fois l'implication des exosomes dans la propagation de la pathologie amyloïde dans la MA (RAJENDRAN et al., 2006). Des études *in vitro* ont ensuite permis de mettre en évidence la présence également d'APP, de ses métabolites (APP-CTFs, A β et AICD) ainsi que des protéases impliquées dans le métabolisme de l'APP (BACE, PS1, PS2, ADAM10) au sein des exosomes (VINGTDEUX et al., 2007 ; SHARPLES et al., 2008). De façon intéressante, la première étude, réalisée par le Dr Vingtdeux, montre par ailleurs que l'alcalinisation des lysosomes induite par un traitement à la chloroquine entraîne un enrichissement de l'AICD dans les vésicules exosomales sécrétés par des neuroblastomes surexprimant l'APPwt (VINGTDEUX et al., 2007). Au contraire, l'inhibition de la γ -sécrétase provoque une forte augmentation de la sécrétion des APP-CTFs associés aux exosomes (VINGTDEUX et al., 2007 ; SHARPLES et al., 2008) Alors que ces données ont été obtenues dans des modèles de surexpression de l'APP, l'étude récente du Dr Laulagnier montre que les neurones corticaux sécrètent de façon endogène de l'APPfl et des APP-CTFs. Ces auteurs observent la présence de deux APP-CTFs dans les exosomes et proposent qu'ils correspondent au C83 et à auCTF- η . Dans la suite de cette étude, les chercheurs montrent que le contenu des exosomes sécrétés par des neuroblastomes N2a surexprimant l'APPwt (sauvage) ou l'APPswe (mutation suédois) est différent. En effet, les exosomes purifiés à partir des N2a APPwt présentent un enrichissement en C83 et CTF- η , similaire aux neurones, alors que pour ceux issus des N2a APPswe sont enrichis en C83 et C99, le CTF- η n'étant pas détectable. Toutefois l'inhibition de BACE1 dans ce dernier modèle entraîne une augmentation des niveaux exosomaux de CTF- η , pouvant s'expliquer par un clivage important du CTF- η en C99 lorsque la forme mutée de l'APP est exprimée. Enfin, ces deux types cellulaires présentent également un enrichissement exosomal en A β_{40} et A β_{42} (LAULAGNIER et al., 2018). Une autre étude suggère l'importance de l'ubiquitinylation de l'APP pour son transport vers les MVB puis les exosomes. En effet, Williamson et collaborateurs ont montré que les exosomes sécrétés par des

cellules exprimant une forme mutée de l'APP, non-ubiquitinylable, présentent une diminution de la quantité d'APP-CTFs exosomaux. Dans les cellules exprimant ce mutant, l'APP est alors relocalisé à la membrane des endosomes précoces, favorisant son clivage en A β qui est médié en grande partie par PS2 dans ce compartiment (WILLIAMSON et al., 2017).

La présence de l'APP, des APP-CTFs, de l'A β et des protéines impliquées dans le clivage de l'APP (BACE1, ADAM10, nicastrine) dans les exosomes a également été confirmée *in vivo*, grâce à la purification de ces vésicules à partir de cerveaux de souris. Plus précisément, les souris Alzheimer (Tg2546) présentent une augmentation des niveaux d'APPfl et de CTFs contenus dans les exosomes, en comparaison avec les souris sauvages. De façon intéressante, les APP-CTFs sont enrichis dans la fraction exosomale par rapport à l'APPfl et en comparaison avec l'homogénat de cellules, bien qu'il n'y ait pas de différence en termes de nombre de vésicules sécrétées (PEREZ-GONZALEZ et al., 2012). La présence des sécrétases à ce niveau peut suggérer deux origines différentes des APP-CTFs enrichis dans les exosomes : (1) ces APP-CTFs peuvent être transportés depuis les MVB et/ou (2) produits directement dans ces vésicules à partir de l'APP transporté. Cependant, l'environnement de ces vésicules caractérisée par un pH neutre est plus en faveur de l'activité α -sécrétase que des activités β - ou γ -sécrétases, ces sécrétases étant probablement peu efficaces dans les exosomes. Au contraire, certaines métalloprotéinases, comme les α -sécrétases ADAM-10 et ADAM-17, qui sont fortement présentes dans les exosomes, ont des rôles physiologiques importants dans ce compartiment (SHIMODA et KHOKHA, 2017). Enfin, contrairement à l'APPfl ou les APP-CTFs, l'A β contenu dans les exosomes ne constitue qu'une petite fraction de l'A β totale (<1%) (RAJENDRAN et al., 2006). Ceci peut s'expliquer par l'orientation de l'APP dans la membrane des exosomes. En effet, la partie N-terminale (contenant la séquence A β) se situe dans la partie extravésiculaire et donc la potentielle coupure du C99 par la γ -sécrétase au sein de ces vésicules entrainerait alors un relargage de l'A β dans l'espace extracellulaire (PISITKUN et al., 2004).

Rôle des métabolites de l'APP dans les exosomes La mise en évidence de la présence d'A β et des APP-CTFs dans les exosomes a conduit à plusieurs hypothèses quant à leur rôle dans la maladie. Les données à ce sujet sont aujourd'hui encore assez obscures. Tout d'abord, plusieurs études ont cherché à évaluer l'impact d'une inhibition de la sécrétion exosomale dans des modèles Alzheimer, afin de

déterminer le caractère bénéfique ou délétère des exosomes dans la pathologie. Deux études réalisées par le groupe du Dr Bieberich proposent l'implication des exosomes dans la formation des plaques amyloïdes chez le modèle 5xFAD. En effet, dans la première étude, les auteurs montrent que les exosomes stimulent l'agrégation de l'A β *in vitro* et *in vivo* et entraîne une réduction de sa capture par les microglies. Ils ont ensuite utilisé une approche pharmacologique pour inhiber la sécrétion exosomale chez les souris 5xFAD, grâce à un inhibiteur de la nSMase (GW4869). Ce traitement induit bien une baisse de la sécrétion exosomale et conduit également à une réduction de l'A β_{42} et du nombre de plaques (DINKINS et al., 2014). Ces résultats ont été confirmés dans une seconde étude basée sur une approche génétique invalidant la nSMase dans le modèle 5xFAD. Chez ces souris, une réduction des plaques est observée ainsi qu'une amélioration quasi-totale de l'ensemble des phénotypes pathologiques associés à la MA : l'activation gliale, la dégénérescence neuronale, l'hyperphosphorylation de Tau et des défauts de fonctions cognitives (DINKINS et al., 2016).

D'autres effets pathologiques des exosomes ont été révélés par d'autres équipes. Par exemple, le Dr Zheng a démontré que l'injection d'exosomes purifiés à partir de cellules HEK APP^{swe/ind} (mutations suédoise et indienne) dans l'hippocampe de souris sauvages provoque des altérations de la neurogenèse, se traduisant par une diminution des neurones immatures nouvellement formés et de la prolifération des progéniteurs neuronaux (T. ZHENG et al., 2017). Enfin, des expériences *in vitro* ont proposé un rôle des exosomes dans la neuroinflammation, autre caractéristique de la MA. En effet, il a été observé que le traitement de microglies avec des exosomes dérivés de neuroblastomes exprimant l'APP^{swe} entraîne graduellement une perte de la capacité de clairance de l'A β par les microglies, accompagnée d'une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (FERNANDES et al., 2018).

De façon inverse, il semblerait que les exosomes issus de cellules naïves sont protecteurs et peuvent servir à neutraliser l'A β circulant. En effet, une étude a montré que l'infusion en intracérébroventriculaire d'exosomes dérivés des neuroblastomes N2a empêche l'inhibition de la LTP induite par des oligomères d'A β . Cet effet passerait par une fixation des A β_o sur la protéine PrPc présente à la surface des exosomes, une invalidation des cellules pour le PrPc entraînant une perte de cet effet. Cet effet neuroprotecteur de PrPc exosomal a été confirmé par un autre groupe qui a montré que le PrPc favorise la formation de fibrilles d'A β , réduisant ainsi les formes les plus toxiques à savoir les oligomères (FALKER et al., 2016). De la même manière, les

travaux du Dr Yuyama suggèrent que des exosomes dérivés de neurones, enrichis en glycosphingolipides, sont capables de fixer l'A β . En effet, l'infusion de ces exosomes dans les cerveaux de souris APP/PS1 réduit les dépôts d'A β (YUYAMA et al., 2014; YUYAMA et al., 2015). Enfin, d'autres études proposent que les exosomes puissent aussi participer à la dégradation d'A β en transportant des enzymes impliquées dans sa dégradation, comme la néprylisine (KATSUDA et al., 2013) ou l'IDE (BULLOJ et al., 2010).

En ce qui concerne le rôle des exosomes dans la MA chez l'Homme, les données sont très restreintes. Néanmoins, le Dr Rajendran a montré que les marqueurs exosomaux sont enrichis dans les plaques séniles de patients Alzheimer (RAJENDRAN et al., 2006). De plus, une étude très récente du Dr Sinha propose que les exosomes purifiés à partir de cerveaux de patients Alzheimer contiennent des niveaux élevés d'oligomères d'A β (néocortex temporal). Les auteurs démontrent également que ces exosomes sont capables de transmettre les oligomères à des neuroblastomes différenciés ou des iPCS humaines, par internalisation des exosomes, et de provoquer une cytotoxicité dans la cellule receveuse (SARDAR SINHA et al., 2018). Au contraire, l'inhibition de la formation, de la sécrétion ou de la capture des exosomes permet de réduire la progression des oligomères d'A β et leur toxicité (SARDAR SINHA et al., 2018). Il est important de noter que dans cette étude, l'identification de formes oligomériques d'A β dans les exosomes est basée uniquement sur deux anticorps le 82E1 et le mAb158, qui dans nos mains ne sont pas spécifiques d'A β oligomériques. La nature de ces espèces contenues dans les exosomes sera discutée dans la partie [IV Discussion et perspectives](#). De façon comparable, le Dr Peréz-Gonzales a montré très récemment que les exosomes provenant de cerveaux de patients atteints de trisomie 21, présentant de nombreuses similarités avec la MA, transportent l'APPfl, les APP-CTFs et des protéines impliquées dans le métabolisme de l'APP (ADAM10, BACE1, nicastrine), mais l'étude ne montre pas la présence d'A β (PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2019). Dans une étude antérieure, cette équipe avait observé une augmentation du nombre d'exosomes sécrétés chez les patients trisomiques (GAUTHIER et al., 2017). D'autre part, des analyses sur un modèle de souris trisomiques (Ts2) révèlent que l'augmentation des APP-CTFs exosomaux est progressive avec l'âge. Une autre équipe a également observé la présence d'APP-CTFs dans le LCR de patients Alzheimer (GARCÍA-AYLLÓN et al., 2017). Ces protéines étant membranaires, il semble fortement probable que les APP-CTFs observées soient en association avec les exosomes. Enfin, si à ce jour la transmission d'A β exogène a bien été démontrée dans des modèles de souris

notamment par l'équipe de Jucker en 2010, seulement une équipe avait suggéré une potentielle transmission iatrogénique d'A β entre humains en 2015 (JAUNMUKTANE et al., 2015). Cependant, cette étude n'a jamais été reproduite. À ce jour, les maladies à prions restent donc les seules à se transmettant entre les Hommes.

Les APP-CTFs exosomaux comme marqueur du dysfonctionnement endosomal ?

Comme décrit auparavant, de nombreux travaux ont démontré un rôle des APP-CTFs, et plus particulièrement du C99, dans la pathologie endolysosomale observée dans la MA. De façon très intéressante, des études récentes suggèrent aussi un lien étroit entre le dysfonctionnement endosomal et la sécrétion d'exosomes enrichis en APP-CTFs (MIRANDA et PAOLO, 2018). En effet, les travaux de l'équipe du Dr Di Paolo montrent qu'un dysfonctionnement endolysosomal-autophagique, induit par l'invalidation génétique ou l'inhibition pharmacologique de la PI3 kinase VSP34 (enzyme qui permet la formation du PIP3) , conduit à la sécrétion d'exosomes anormalement enrichis en APP-CTFs mais aussi en substrats autophagiques comme p62 ou des protéines polyubiquitinylées. De plus, les exosomes sécrétés suite à l'inhibition de Vsp34 présentent également une composition particulière en lipides. En effet, ils sont riches en céramides et en phospholipides BMP — pour "Bis-Monoacylglycero-Phosphate" —, ce dernier étant présent dans les membranes des endosomes tardifs mais normalement absent dans les exosomes (BISSIG et GRUENBERG, 2013) (voir [Figure 8.1](#)). Cette étude est particulièrement intéressante car une déficience en PIP3 a été rapportée dans les cerveaux de patients Alzheimer. Les auteurs proposent donc les APP-CTF exosomaux comme biomarqueurs précoces de la pathologie endolysosomale associée MA. Ces aspects seront abordés dans la partie résultats [9.3.1 Étude du lien entre dysfonctionnement lysosomal-autophagique et exosomes](#) et également dans la partie [IV Discussion et perspectives](#).

De nombreuses études montrent la présence des APP-CTFs et de l'A β dans les exosomes, mais à ce jour le rôle de ces métabolites reste inconnu. Il est possible que dans un premier temps cette sécrétion exosomale soit bénéfique, permettant l'élimination de ces catabolites dont la toxicité a largement été démontrée en intracellulaire. Dans un deuxième temps, cette sécrétion pourrait devenir pathologique en contribuant à la propagation de ces catabolites toxiques. Les exosomes contenant les catabolites de l'APP et les enzymes né-

cessaires à leur clivage pourraient devenir une source de production de l'A β particulièrement neurotoxique .

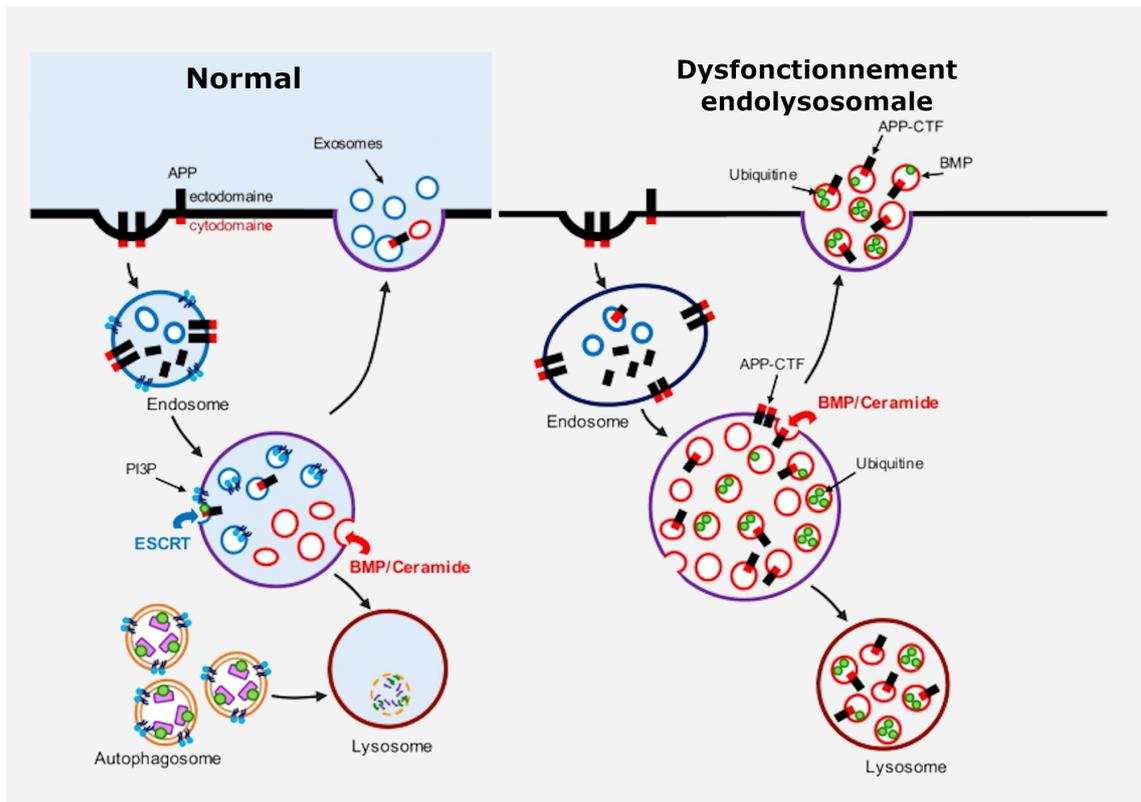


Figure 8.1.: Lien entre dysfonctionnement EAL et sécrétion exosomale

Schéma simplifié du modèle proposé par le Dr. Miranda et mettant en avant l'augmentation de la sécrétion d'exosomes enrichis en C99 ou en BMP en réponse à un dysfonctionnement endolysosomal. (Source : MIRANDA et PAOLO, 2018)

Axe 2 : Enrichissement des formes oligomériques d'APP-CTFs dans les exosomes issus de modèles Alzheimer

Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai eu l'occasion de participer à un nouveau projet du laboratoire s'intéressant au rôle des APP-CTFs exosomaux dans la maladie d'Alzheimer. Ces premiers travaux ont donné lieu à une publication, pour laquelle je suis co-première autrice avec le Dr Inger Lauritzen, en charge de ce projet. Dans ce chapitre, je présenterai les hypothèses et objectifs initiaux de ce projet ainsi que l'article récemment accepté pour publication dans la revue "Translational Neurodegeneration" (LAURITZEN et al., 2019). Enfin, j'introduirai quelques perspectives de travail, qui découlent de résultats préliminaires.

9.1 Hypothèse et objectifs

Comme décrit auparavant, plusieurs travaux récents ont démontré une accumulation intraneuronale précoce du fragment C99 dans des modèles de la MA et mon équipe a été la première à suggérer un lien entre cette accumulation et un dysfonctionnement lysosomal-autophagique. L'accumulation du C99 serait à la fois la conséquence et la cause de ce dysfonctionnement (LAURITZEN et al., 2016). Plus précisément, il a été démontré dans ce travail que le traitement avec un inhibiteur de la γ -sécrétase (le D6) chez des souris 3xTg-AD ou AAV-C99 conduit (1) à l'augmentation des niveaux de C99 et d'un de ses dérivé le C83 et (2) également à l'aggravation de la pathologie lysosomal-autophagique. De façon intéressante, les

études immunohistochimiques ont également révélé, en plus de cette augmentation de C99 au niveau des compartiments endolysosomiaux et autophagiques, une forte immunoréactivité extracellulaire associée au C99 chez les souris traitées au D6. Cette observation était particulièrement surprenante puisque le C99 est un fragment transmembranaire, qui n'est pas supposé être retrouvé dans l'espace extracellulaire. Nous avons donc émis l'hypothèse que ce marquage pouvait correspondre à du C99 présent dans les exosomes, hypothèse d'autant plus fondée que de nombreux travaux récents proposent un lien entre le système endolysosomal et la sécrétion exosomale.

En effet, plusieurs études récentes ont mis en évidence l'enrichissement des APP-CTFs y compris le C99, dans les exosomes issus de divers modèles de la MA. Cependant, il y a l'heure actuelle très peu d'informations sur les mécanismes à l'origine de cette accumulation exosomale, sur le devenir des APP-CTFs exosomaux ou sur leurs rôles dans la MA.

Le but de cet axe a donc consisté à purifier et caractériser des exosomes sécrétés par différents modèles cellulaires et murins de la MA pour répondre aux objectifs suivants :

1. confirmer la présence d'APP-CTFs dans ces vésicules extracellulaires
2. étudier l'impact d'une inhibition de la γ -sécrétase sur le contenu de ces exosomes
3. comprendre, à plus long terme, la potentielle toxicité de ces exosomes enrichis en APP-CTFs et leur contribution dans la propagation de la pathologie.

9.2 Article 2

L'inhibition de la gamma-sécrétase entraîne l'enrichissement des oligomères d'APP-CTFs dans les vésicules extracellulaires sécrétées dans le cerveau de modèles de souris de la maladie d'Alzheimer

I. Lauritzen*, A. Bécot*, A. Bourgeois, R. Pardossi-Piquard, M-G Biferi, Martine Barkats et F. Checler

9.2.1 Résumé

Le but initial de ce projet était d'identifier la nature exacte du marquage extracellulaire observé dans le cerveau des souris 3xTg-AD et AAV-C99 et de déterminer l'effet d'une inhibition de la γ -sécrétase sur le devenir des APP-CTFs. Le traitement des souris avec un inhibiteur de la γ -sécrétase (D6) entraîne une accumulation de C99 dans les compartiments endosomaux et lysosomaux mais également une augmentation du marquage extracellulaire associé au C99.

Dans cet article nous confirmons la présence des APP-CTFs dans les exosomes et démontrons, pour la première fois, un enrichissement exosomal d'APP-CTFs sous forme oligomérique. En effet, plusieurs travaux récents basés sur des approches *in vitro* et purement biochimiques, avaient déjà proposé la dimérisation du C99. Cependant aucune étude n'avait confirmé la présence de ces dimères dans des modèles *in vivo*. Les études biochimiques précédentes ont permis de mettre en évidence la présence de certains motifs (GXXXG) dans la séquence de l'APP et du C99 qui seraient importants pour la dimérisation. En effet, la substitution des glycines (G) en leucines (L) dans ces motifs favoriseraient la formation de dimères. Dans ce dernier travail, nous montrons que les niveaux de ces oligomères sont très faibles et quasi indétectables dans les cellules alors qu'ils sont au contraire, enrichis dans les exosomes, leur taux pouvant dépasser celui des monomères dans ce compartiment. De plus, nos travaux démontrent qu'une inhibition de la γ -sécrétase (traitement au D6 ou l'inactivation des présénilines) favorise cette oligomérisation et la présence de ces oligomères dans les exosomes. Enfin, la présence de plusieurs bandes de taille différente et associées au C99 suggère que le C99, en plus de former des dimères, peut s'associer au C83 pour former des hétérodimères ainsi que des oligomères. Je résumerai par la suite les principaux résultats de ce travail.

Dans un premier temps, nous avons cherché à caractériser les exosomes purifiés à partir de différents modèles cellulaires (SH-SY5Y ou HEK-293 exprimant l'APP_{sw} ou le C99) ou murins (3xTg-AD ou AAV-C99) de la MA. Ces expériences ont permis de mettre en évidence l'enrichissement du C99 et de son dérivé le C83 dans les exosomes, par rapport au contenu cellulaire et par rapport au précurseur APP. Il est important de noter que ce phénotype est observé dans les conditions où le

C99 est surexprimé directement ou produit par protéolyse de l'APP_{swE}. De façon intéressante, l'inhibition de la γ -sécrétase, en plus d'augmenter les niveaux exosomaux de C99 et de C83, entraîne une importante accumulation d'APP-CTFs de haut poids moléculaire dans les exosomes, ces espèces étant difficilement détectables dans les cellules ou le tissu cérébral. Au contraire, l'inhibition pharmacologique de la sécrétion exosomale par le GW4869 conduit à une forte augmentation de ces APP-CTFs de haut poids moléculaire en intracellulaire, alors que les niveaux de C99 et du C83 ne sont que modestement altérés. Une étude plus approfondie nous a permis de détecter ces fragments également dans les exosomes issus de cellules non-traitées au D6 ou en intracellulaire dans des cellules traitées au D6, dans les deux cas leur concentration est néanmoins très faible. Ces résultats suggèrent donc que (1) la formation de ces APP-CTFs de haut poids moléculaire peut se produire en intracellulaire et que (2) ces APP-CTFs sont ensuite enrichis dans les exosomes, ce mécanisme étant favorisé lors d'une inhibition de la γ -sécrétase.

Dans un deuxième temps, nous avons cherché à déterminer la nature exacte de ces APP-CTFs de haut poids moléculaire. Tout d'abord, la présence de plusieurs bandes et leur taille respective nous laissaient penser qu'il pouvait s'agir d'oligomères d'APP-CTFs. Cette hypothèse a été confirmée grâce à la combinaison d'approches immunologique, pharmacologique et génétique. En effet, les espèces de haut poids moléculaire révélées dans les exosomes, et augmentées en condition D6, ressemblent parfaitement à celles observées dans les mutants de dimérisation C99 G33L et C99 G29L/G33L. L'utilisation d'un inhibiteur de l' α -sécrétase et d'anticorps N- ou C-terminaux de l'APP suggère que ces espèces pourraient correspondre plus précisément à des homo- (C99 ou C83) ou à des hétéro- (C99/C83) oligomères.

Dans un troisième temps, nous avons voulu comprendre la raison d'un tel enrichissement sélectif des oligomères dans les exosomes. Une hypothèse serait que les oligomères auraient une localisation subcellulaire distincte de celle C99 monomérique. Pour valider celle-ci, nous avons donc réalisé des analyses immunocytochimiques et comparé des cellules exprimant le C99, traitées ou non avec le D6, avec celles exprimant les mutants de C99. Ces études ont permis de montrer que les monomères de C99 (observés en condition basale) sont localisés principalement au niveau du trans-Golgi, alors que les formes oligomériques sont majoritairement associées aux compartiments endosomaux et lysosomaux. Cette redistribution des oligomères d'APP-CTFs explique donc bien leur présence dans les exosomes.

Dans un quatrième temps, nous avons voulu vérifier que l'effet du D6 sur l'oligomérisation des APP-CTFs était bien liée à un blocage de la γ -sécrétase. En effet, l'utilisation de fibroblastes invalidés pour les présénilines 1 et 2 (MEF PS1/2^{-/-}) permet de mimer les observations décrites avec le D6, à savoir l'augmentation des oligomères d'APP-CTFs et leur localisation dans les endosomes et lysosomes.

Dans un cinquième temps, le but a été de mieux comprendre le ou les mécanismes à l'origine de l'accumulation des oligomères préférentiellement dans ces compartiments intracellulaires. De façon logique, nous avons supposé que la principale raison était liée au fait que l'activité de la γ -sécrétase dans cette voie ait lieu principalement dans les endosomes. L'inhibiteur D6 augmenterait donc spécifiquement la concentration des APP-CTFs dans ces compartiments. D'autre part, il a été intéressant de constater que les mutants de dimérisation ont une double localisation, endolysosomale et trans-Golgienne. Ces observations pourraient suggérer que l'oligomérisation ne se fait qu'au niveau des endosomes, en raison (1) soit d'un défaut de clivage de ces mutants par la γ -sécrétase à ce niveau (ce qui semble peu probable car nous avons observé des taux d'A β plus importants avec ces mutants), (2) soit d'un environnement (lipides, pH acide etc) favorable à l'oligomérisation et donc spécifique aux endosomes. Une deuxième raison pouvant expliquer l'accumulation des oligomères dans les endolysosomes pourrait être une rétention particulière dans ces compartiments, liée à une altération de leur transport intracellulaire. En effet, nos analyses de co-immunoprécipitation suggèrent que l'inhibition de la γ -sécrétase altère le transport rétrograde vers le trans-Golgi en diminuant l'interaction des oligomères d'APP-CTFs avec la protéine SORLA. Donc, au lieu d'être transporté vers le TGN, les oligomères s'accumulent dans les compartiments endolysosomaux y compris les exosomes. Ces deux mécanismes pourraient ainsi contribuer à l'augmentation des oligomères dans les endosomes puis les exosomes.

En conclusion, cette étude est la première à démontrer (1) la présence d'oligomères d'APP-CTFs dans les exosomes issus de cerveau de souris Alzheimer et (2) l'augmentation de l'oligomérisation des APP-CTFs lorsque la γ -sécrétase est inhibée.

9.2.2 Article en anglais

RESEARCH

Open Access

Targeting γ -secretase triggers the selective enrichment of oligomeric APP-CTFs in brain extracellular vesicles from Alzheimer cell and mouse models

Inger Lauritzen^{1†}, Anaïs Bécot^{1†}, Alexandre Bourgeois¹, Raphaëlle Pardossi-Piquard¹, Maria-Grazia Biferi², Martine Barkats² and Frédéric Checler^{1*}

Abstract

Background: We recently demonstrated an endolysosomal accumulation of the β -secretase-derived APP C-terminal fragment (CTF) C99 in brains of Alzheimer disease (AD) mouse models. Moreover, we showed that the treatment with the γ -secretase inhibitor (D6) led to further increased endolysosomal APP-CTF levels, but also revealed extracellular APP-CTF-associated immunostaining. We here hypothesized that this latter staining could reflect extracellular vesicle (EV)-associated APP-CTFs and aimed to characterize these γ -secretase inhibitor-induced APP-CTFs.

Methods: EVs were purified from cell media or mouse brains from vehicle- or D6-treated C99 or APP_{swedish} expressing cells/mice and analyzed for APP-CTFs by immunoblot. Combined pharmacological, immunological and genetic approaches (presenilin invalidation and C99 dimerization mutants (GXXXG)) were used to characterize vesicle-containing APP-CTFs. Subcellular APP-CTF localization was determined by immunocytochemistry.

Results: Purified EVs from both AD cell or mouse models were enriched in APP-CTFs as compared to EVs from control cells/brains. Surprisingly, EVs from D6-treated cells not only displayed increased C99 and C99-derived C83 levels but also higher molecular weight (HMW) APP-CTF-immunoreactivities that were hardly detectable in whole cell extracts. Accordingly, the intracellular levels of HMW APP-CTFs were amplified by the exosomal inhibitor GW4869. By combined pharmacological, immunological and genetic approaches, we established that these HMW APP-CTFs correspond to oligomeric APP-CTFs composed of C99 and/or C83. Immunocytochemical analysis showed that monomers were localized mainly to the *trans*-Golgi network, whereas oligomers were confined to endosomes and lysosomes, thus providing an anatomical support for the selective recovery of HMW APP-CTFs in EVs. The D6-induced APP-CTF oligomerization and subcellular mislocalization was indeed due to γ -secretase blockade, since it similarly occurred in presenilin-deficient fibroblasts. Further, our data proposed that besides favoring APP-CTF oligomerization by preventing C99 proteolysis, γ -secretase inhibitor also led to a defective SorLA-mediated retrograde transport of HMW APP-CTFs from endosomal compartments to the TGN.

(Continued on next page)

* Correspondence: checler@ipmc.cnrs.fr

[†]Inger Lauritzen and Anaïs Bécot contributed equally to this work.

¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR7275, team labeled «Fondation pour la Recherche Médicale» et «Laboratoire d'excellence Distal», Université de Nice-Sophia-Antipolis, Sophia-Antipolis, France

Full list of author information is available at the end of the article



(Continued from previous page)

Conclusions: This is the first study to demonstrate the presence of oligomeric APP-CTFs in AD mouse models, the levels of which are selectively enriched in endolysosomal compartments including exosomes and amplified by γ -secretase inhibition. Future studies should evaluate the putative contribution of these exosome-associated APP-CTFs in AD onset, progression and spreading.

Keywords: Extracellular vesicles, C99, APP-CTFs, Homo- and hetero-oligomerization, Endosomes, Lysosomes, *trans*-Golgi network, SorLA, γ -Secretase inhibition, Presenilin knockout, Alzheimer's disease

Background

A growing body of evidence indicate that the β -secretase-derived fragment of β APP C99 (β CTF) accumulates in brains from various AD mouse models [1] as well as in brains from AD-affected patients [2–5] or in induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from monogenic AD [6]. C99 accumulation was found to mainly occur within endolysosomal compartments and be both a cause and consequence of lysosomal dysfunction [7–9]. Moreover, its accumulation was proposed to be linked to neuronal hyperactivity [10] and LTP alterations [11]. Unexpectedly, our previous work on the 3xTgAD mouse model demonstrated that endolysosomal-associated C99 was only detected with N-terminal-directed and aggregate-specific antibodies but not with C-terminal-directed APP antibodies. This staining was strongly increased in γ -secretase inhibitor treated-mice, in which not only C99 but also C99-derived C83 (hereafter referred to as APP-CTFs) levels were enhanced and those of A β reduced, ruling out the possibility that it could be ascribed to A β . However, why this endolysosomal APP-CTF immunoreactivity presents an “aggregate-like” conformation remained to be established. Using the AAV-C99 mouse model, expressing C99 in absence of APP overexpression, we delineated the presence of two distinct APP-CTF immunolabelings. Although we confirmed an endolysosomal-associated staining revealed by N-terminal directed and aggregate specific antibodies in these mice, an additional Golgi-associated staining was recovered by means of antibodies targeting the C-terminal moiety of APP-CTFs, thus proposing the presence of two distinct immunoreactive APP-CTF species. Strikingly, the N-terminal and aggregate-specific antibodies also revealed a diffuse and extracellular immunostaining that was aAAV-C99 and 3xTgAD micelso strongly increased in γ -secretase inhibitor-treated animals. Since APP-CTFs are membrane-embedded, and thus, should not be recovered in the extracellular space, we postulated that this staining could correspond to exosome-associated APP-CTFs, which would then be particularly important in γ -secretase-treated animals. Amyloidogenic APP processing is thought to mainly occur in the endosomal system [12, 13], in which exosomes are formed [14], but previous studies have shown that in AD, the exosomal content of A β is actually quite low and accounts for less than 1% of the total A β content [15]. Conversely, a growing body

of evidence indicates that the membrane-bound APP-CTFs, including the C99 fragment, the direct precursor of A β [16], are abundant in extracellular vesicles [17, 18], but little is known about the mechanisms underlying their exosomal accumulation, role, fate and subsequent functional consequences. In the present work, we confirmed the strong abundance of APP-CTFs in purified extracellular vesicles (EVs) from various cellular and mouse AD models and found that the treatment with the γ -secretase inhibitor D6 led to further increased levels of C99 and C99-derived C83. Surprisingly, D6 treatment also unraveled the occurrence of several high molecular weight (HMW) APP-CTFs, the levels of which were hardly detectable in cell or brain homogenates. Previous in vitro data suggest that C99 can exist not only as monomers but also as dimers and that dimerization is favored by three repeats of the glycine-xxx-glycine (GXXXG) motif present in the juxtamembrane and transmembrane regions [19]. Thus, we questioned whether these HMW APP-CTFs could be dimeric/oligomeric APP-CTFs and used pharmacological and immunological approaches, as well as GXXXG dimerization mutants [19] to determine the exact nature of those APP-CTFs. Taken together, we establish that these HMW APP-CTFs indeed correspond to dimeric/oligomeric APP-CTFs, including not only C99 homodimers but also C83 homodimers and C99/C83 oligomers. Furthermore, our data showed that the selective recovery of dimeric/oligomeric APP-CTFs in EVs is linked to their intracellular mislocalization to the endolysosomal network due partly to a defective SorLA-mediated retrograde sorting of dimeric APP-CTFs to the TGN.

Materials and methods

Animals, viral infection and ELND006 treatment

3xTgAD (harboring β APP_{SWE} and Tau_{P301L} transgenes on a PS1_{M146V} background) and non-transgenic (wild-type) mice [20] were generated from breeding pairs provided by Dr. LaFerla (Irvine, USA). AAV-10 production and AAV-mediated in vivo delivery was described previously [7]. Briefly, 1 day old C57BL6 mice (Janvier Labs., France) were injected unilaterally with 4 μ l of AAV virus, AAV-C99 or AAV-free (under control of the synapsin I promoter) (5.5×10^{12} vg/ml (viral genomes *per* ml)) into the left lateral ventricle and mice were analyzed at 2 months post-AAV delivery. 3xTgAD and wild-type mice,

125 as well as AAV-infected mice were treated daily for 15
126 days with the γ -secretase inhibitor ELND006, referred to
127 as D6 hereafter (30 mg/kg, Elan Pharmaceuticals, San
128 Francisco) or with vehicle alone (methylcellulose/polysor-
129 bate 80, Sigma) via oral gavage, as described [21]. For the
130 purification of brain EVs (see below), mice were anesthe-
131 tized by intraperitoneal injection of Ketamine (100 mg/kg)
132 and Xylazine (24 mg/kg) and intracardiacally perfused
133 with PBS before sacrifice. For immunohistochemistry,
134 mice were perfused intracardiacally with PBS followed by
135 paraformaldehyde 4% before collecting the brains. All ani-
136 mals were housed with a 12:12 h light/dark cycle and were
137 given free access to food and water and experimental pro-
138 cedures were in accordance with the European Communi-
139 ties Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC)
140 and local French legislation.

141 Plasmid constructs

142 The pcDNA₃ SPC99^{G33L} construct was generated using
143 the QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit (Agi-
144 lent Technologies) with pcDNA₃ SPC99 previously de-
145 scribed (flammang 2012) and appropriated primers: 5'-
146 AAG GCG CAA TCA TTC TAC TCA TGG TGG GCG
147 GTG - 3' and 5' - CAC CGC CCA CCA TGA GTA GAA
148 TGA TTG CGC CTT - 3'. The pcDNA₃ SPC99^{G29L/G33L}
149 plasmid was obtained using the same protocol with the
150 pcDNA₃ SPC99^{G33L} previously generated and the follow-
151 ing primers: 5' - GGG TTC AAA CAA ACT CGC AAT
152 CAT TCT ACT C - 3' and 5' - GAG TAG AAT GAT
153 TGC GAG TTT GTT TGA ACC C - 3'). The doxycyclin-
154 inducible pSBtet SPC99 construct used for stable cell line
155 generation was obtained as following. First, the SPC99
156 fragment was amplified by PCR from the pcDNA₃ SPC99
157 using the following primers (5' - ATA TTA GGC CTC
158 TGA GGC CCC ACC ATG CTG CCC GGT TTG GCA
159 C - 3' and 5' - GAT GGC CTG ACA GGC CCT AGT
160 TCT GCA TCT GCT CAA AGA ACT TG TAG GTT -
161 3') to introduce the SfiI restriction site at both 5' and 3'
162 end of fragment. The resulting product was then digested
163 by SfiI and subcloned into the pSBtet vector. All con-
164 structs were verified by sequencing. Rab5-GFP, Rab7-GFP
165 and Lamp1-GFP were from Addgene and the SorLA_{myc}
166 construct was a kind gift from Peter St-George-Hyslop.

167 Cell culture and treatment

168 Human neuroblastoma (SH-SY5Y, ATTC or SH-SY5Y-
169 APP^{swe} [22]), human embryonic kidney cells (HEK293,
170 ATTC), human epitheloid cervix carcinoma (HeLa, ATCC)
171 and mouse embryonic fibroblasts (MEFs, wildtype or de-
172 void of PS1 and PS2, PS1/2^{-/-}) [23] were cultured in Dul-
173 becco's modified Eagle's medium supplemented with 10%
174 fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin
175 (50 μ g/ml) purchased from Life Technologies (CA, USA)
176 at 37 °C/5% CO₂. Transient transfections of cells were

carried out using Lipofectamine 2000 (Life Technologies) 177
for SH-SY5Y and MEFs and JetPrime (Polyplus transfection) 178
for HEK293 and HeLa cells, according to the manu- 179
facturer's instructions, and cells were recovered 24–36 h 180
post-transfection. For immunofluorescence analysis, some 181
cells were co-transfected with C99 or C99^{G29L/G33L} and 182
plasmids expressing intracellular organelle-specific proteins 183
(Rab5-GFP, Rab7-GFP and Lamp1-GFP, Addgene). Stable 184
inducible HEK293 and SH-SY5Y cell lines were obtained 185
by co-transfection of the Sleeping Beauty inducible vector 186
(pSBtet SPC99) and the transposase SB100 using JetPrime 187
and Lipofectamine 2000, as described above, and using 188
puromycin selection. For stable cell lines, protein expres- 189
sion was induced by the addition of doxycyclin (10 μ g/ml 190
final concentration, Sigma) to the cells 24 h before cell 191
treatments: D6, 1 μ M (Elan Pharm.), GI254023X 5 μ M 192
(Sigma), or GW4869 10 μ M (Sigma), which were added to 193
OptiMEM. Cells for western blot analysis were lysed in 194
RIPA buffer and sonicated. For immunocytochemistry, 195
SH-SY5Y cells were grown on poly-D-lysine coated cover- 196
slips and treated as indicated above. 197

Immunostaining of tissue and cells 198

199 Paraformaldehyde-fixed brains (see above) were embed-
200 ded in paraffin and cut on a microtome in 8 μ m thick
201 sections (Thermoscientific, France) or cut directly on a
202 vibratome in 50 μ m thick sections (Thermoscientific,
203 France). Brain sections were treated with formic acid
204 50%/5 min and saturated with 5% BSA/0.1% Triton and
205 then incubated at 4 °C overnight with primary antibodies
206 (NU1 [24], 1:1000) or 4G8 (Covance, 1:2000), followed
207 by Alexa Fluor-488 conjugated anti-mouse (Molecular
208 Probes, 1:1000) and DAPI (Roche, 1:20000) or HRP-
209 conjugated antibodies (Jackson ImmunoResearch, 1:
210 1000) and DAB substrate (Vector). For co-labeling with
211 Iba1 or GFAP vibratome sections were processed as de-
212 scribed and incubated at 4 °C overnight with 4G8 (Cov-
213 ance, 1:2000) and Iba1 (Wako, 1:2000) or anti-GFAP
214 (Abcam, 1:2000) followed by Alexa Fluor-488 and Alexa
215 Fluor-594 conjugated antibodies (Molecular Probes, 1:
216 1000). Cells in culture were paraformaldehyde fixed,
217 permeabilized with 0.1% Triton-X 100 for 10 min, satu-
218 rated in 5% BSA/0.1% Tween20, probed 1 h with pri-
219 mary antibodies (α -APP^{ct}, rabbit polyclonal, gift from
220 Paul Fraser, 1:5000 and in some cases with α -TGN46
221 (Serotec, AHP500G, 1:1000) and detected with Alexa
222 Fluor-488 or Alexa Fluor-590 conjugated antibodies
223 (Molecular Probes, 1:1000). Confocal images were ac-
224 quired using a Zeiss SP5 confocal microscope for cells
225 and an Olympus Fluoview10 confocal microscope for
226 tissue sections. Quantification of APP-CTF localization
227 was performed in a double-blind manner. A total num-
228 ber of 400–500 cells were counted for each condition in
229 3 independent experiments. For each cell, APP-CTF

230 localization was determined as “Golgi/ER” pattern or
231 “endosome/lysosome” pattern.

232 Purification of EVs

233 Cells at about 80% of confluence (minimum 3 × 150 mm
234 dishes per condition) were rinsed twice with PBS and
235 cultivated for another 20–22 h in OptiMEM for exosomal
236 secretion. When using inducible cell lines, protein expres-
237 sion was induced by the addition of doxycycline (10 µg/
238 ml) 1 day before the change to OptiMEM, which also con-
239 tained doxycycline. Media were harvested and spun at
240 2000 g for 20 min and filtered through a 0.22 µm filter.
241 The supernatant was then sequentially centrifuged at
242 10000 g for 30 min and 100,000 g for 125 min. The pellet
243 was washed in ice-cold PBS and centrifuged for another
244 120 min. The final pellet (P100) was resuspended in PBS.
245 For western blot, RIPA buffer 5X× was added and EVs
246 were sonicated in an ultrason bath for 15 min. EVs
247 isolated from the brain extracellular space were purified
248 according to the protocol described by Perez-Gonzalez
249 et al. [25] with minor modifications. As described above,
250 mice were perfused intracardially with ice-cold PBS to
251 remove blood extracellular vesicles. Then, hemibrains
252 were cut in 4–5 pieces and enzymatically and mechan-
253 ically dissociated using “the adult brain dissociation kit”
254 (Miltenyi Biotec) and a GentleMACS Dissociator (Milte-
255 nyi Biotec). 10 ml of PBS was added to the cell suspension,
256 which was then filtered through a 70 µm Smartstrainer.
257 The suspension was then spun at 300 g for 10 min and the
258 supernatant was used for exosome purification and the
259 cell pellet for analysis by western blot. The supernatant
260 was sequentially centrifuged at 2000 g/20 min, 10,000 g/
261 30 min and 100,000 g for 90 min. The pellet was then
262 washed in PBS, centrifuged another 90 min and the pellet
263 was resuspended in 2 ml sucrose 0.95 M and introduced
264 into a sucrose gradient (2, 1.65, 1.3, 0.95, 0.6 and 0.25 M,
265 2 ml each). The sucrose gradient was centrifuged at
266 200000 g/16 h. 1 ml fractions were collected from the top
267 of the gradient and fractions flanking the interphase separ-
268 ating 2 neighboring sucrose layers were pooled together
269 (a-top 1 ml fraction, b-2 ml, c-2 ml, d = 2 ml, e = 2 ml, f =
270 2 ml, and g = bottom 1 ml fractions) diluted with 10 ml
271 PBS and centrifuged at 100000 g for 90 min. Accordingly
272 to the original protocol, our preliminary experiments
273 using wild-type mouse brains showed that 3 fractions (b, c
274 and d) contain extracellular vesicles, thus in all further
275 experiments, these fractions were pooled, centrifuged at
276 100000 g and resuspended in 200 µl of PBS. Then 20 µl
277 was recovered for Nanoparticle tracking analysis (NTA)
278 or electron microscopy (EM), and the remaining extracel-
279 lular vesicles were lysed by the addition of RIPA5X, pro-
280 teinase inhibitors and ultrasonicated. 30 µl of the lysate
281 (corresponding to about 10% of the total volume) was
282 used for each lane on the immuno blots.

Electron microscopy and nanoparticle tracking analysis (NTA) 283

284
285 For EM, a drop of EVs was added to a freshly ionized
286 300 mesh formvar/carbon coated grid and incubated for
287 5 min to allow adherence of the EVs to the grid. The
288 grid was then washed through 5–7 puddles of ddH₂O;
289 and negatively stained in 2% aqueous uranyl acetate for
290 30 s, then visualized using a JEM 1400 electron micro-
291 scope operating at 100 kV equipped with a Morada SIS
292 camera. For NTA, vesicles diluted to the appropriate
293 concentrations to permit counting in the range of 1×10^8 – 1×10^{10}
294 particles/ml were injected into the Nanosight
295 apparatus equipped with a syringe pump (Nanosight
296 NS300, Malvern, France). The EVs were visualized by
297 their scattering with a CCD video camera. Pump speed
298 was set to 50, camera level at 16 and the detection thresh-
299 old at 3. Particle size and number was determined from 3
300 (60 s) videos, and averaged using the NTA software.

Western blot analysis 301

302 Cell or brain homogenates (10 µg) and EV proteins
303 (30 µl) were separated by Bio-Rad 12% stain-free™ TGX
304 FastCast™ acrylamide gels or 16% tris-tricine gels (for the
305 detection of APP-CTFs). Bio-Rad gels were photoacti-
306 vated for the visualization of proteins and used for quan-
307 tification of exosomal proteins (indicated in the Figures
308 as protein stain) before being electrophoretically trans-
309 ferred to nitrocellulose membranes using the Bio-Rad
310 Trans-Blot® Turbo™ Transfer System. Tris-tricine gels
311 were directly transferred to nitrocellulose membranes
312 and boiled in PBS before saturation with milk. Membranes
313 were blotted with the following antibodies: α-APPcter
314 (Rabbit polyclonal, gift from Paul Fraser, 1:1000), WO-2
315 (Sigma, 1:1000), α-Alix (Santa Cruz, 1A2A, sc-53,540, 1:
316 1000), α-Hsc70 (Santa Cruz, B-6, sc-7298, 1:1000), α-Tsg101
317 (Santa Cruz, C-2, sc-7964, 1:1000), α-Flotilin-2 (Santa Cruz,
318 H-90, sc-25,507, 1:500), α-Calnexin (Santa Cruz, AF18, sc-
319 23,954, 1:500) or α-Actin (Sigma, 1:5000). After probing
320 with primary antibodies, immunological complexes were re-
321 vealed with HRP-conjugated antibodies (Jackson ImmunoR-
322 esearch, 1:10000) followed by electrochemiluminescence
323 (Westernbright™ Sirius™ and Quantum™ chemiluminescent
324 HRP substrate, Advansta, France). Immunoblots for APP-
325 CTFs were exposed for various times to ensure the
326 detection of all APP-CTF immunoreactivities and the non-
327 saturation of highly expressed APP-CTFs. Peak height of
328 signal intensities from protein bands were quantified with
329 ImageJ software.

Co-immunoprecipitation experiments 330

331 Stable inducible C99-expressing HEK293 cells were tran-
332 siently transfected with a myc-tagged SorLA construct
333 using Lipofectamine 2000 and treated or not with D6, as
334 described above. Cells were lysed in RIPA buffer and

335 500 µg lysates were precleared with 20 µl Protein A
336 Sepharose (GE Healthcare) for 2 h at 4 °C. Then the
337 supernatant was incubated for 1 h with 1 µl α-APPct
338 antibody before adding 30 µl Protein A Sepharose beads.
339 After several washes in RIPA buffer, the beads were
340 resuspended in SDS sample buffer (2×) and incubated for
341 5 min at 95 °C. 20 µl of the sample was loaded on either
342 8% or 12% Bio-Rad stain-free™ TGX FastCast™ acryl-
343 amide gels and subjected to western blot analysis using
344 either an anti-myc antibody (clone 9E10, Sigma, 1:5000)
345 or α-APPct (1:1000).

346 **Statistical analysis**

347 All quantitative data were subjected to non-parametric
348 tests, the Mann-Whitney U test for single comparison
349 and one-way ANOVA analysis for multiple comparisons
350 followed by Dunnett's post-hoc analysis using GraphPad
351 Prism 7. Data are represented as means ± SEM. Statis-
352 tical significance is represented by asterix * $p < 0.05$,
353 ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$.

354 **Results**

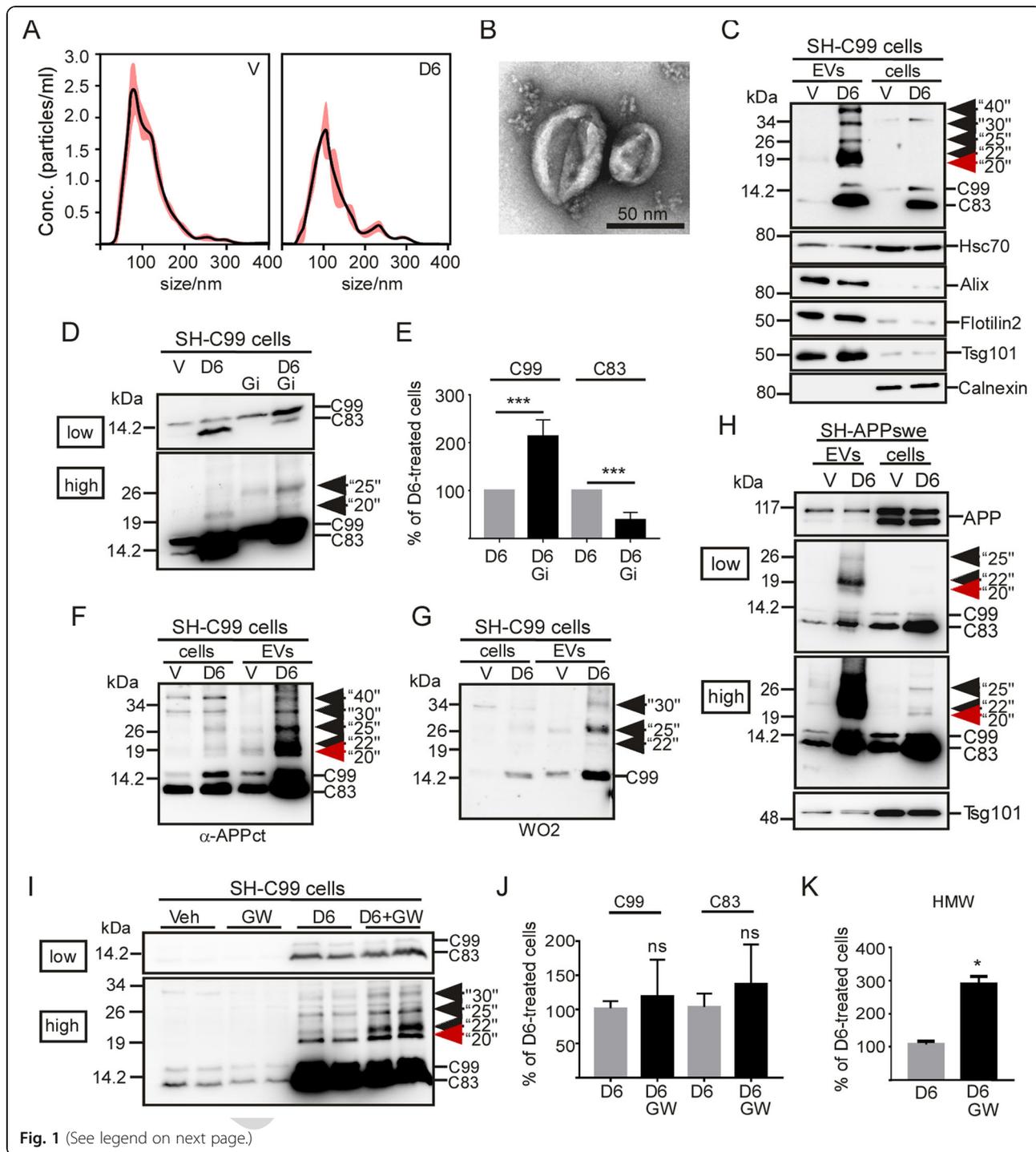
355 **Purified EVs from C99- or APP- expressing cells are** 356 **enriched in APP-CTFs and contain high molecular weight** 357 **APP-CTFs, the levels of which are increased by γ-secretase** 358 **inhibition**

359 Our previous data obtained from immunostaining on
360 brains from 3xTgAD and C99-expressing mice proposed
361 the presence of extracellular vesicle-associated APP-
362 CTFs, the levels of which should be increased in γ-
363 secretase inhibitor treated mice [7]. In order to confirm
364 this hypothesis and to delineate the influence of γ-
365 secretase inhibition on EV- associated APP-CTFs, we
366 first purified EVs secreted from cell media of vehicle- or
367 γ-secretase inhibitor-treated (D6) C99-expressing SH-
368 SY5Y neuroblastoma (SH-C99) (Fig. 1). Vesicle purifica-
369 tion was firstly verified by nanoparticle tracking analysis
370 (NTA) (Fig. 1a) and electron microscopy (Fig. 1b) reveal-
371 ing the presence of cupformed vesicles with a mean
372 diameter around 100 nm, as expected for exosomes [26].
373 Furthermore, immunoblot analysis showed the presence
374 of several exosomal markers (Hsc70, Alix, flotilin-2 and
375 Tsg101) and the total lack of the reticular marker cal-
376 nexin (Fig. 1c), proposing that these EVs could mainly
377 correspond to the endosome-originating exosomes [27].
378 Immunoblot analysis also revealed the presence of C99
379 and C83 in both EVs and whole lysates from SH-C99
380 cells and showed a strong increase in both of these APP-
381 CTFs upon D6 treatment (Fig. 1c). Despite the fact that
382 these cells specifically expressed C99, the levels of C83
383 were higher than C99, and this was particularly the case
384 in EVs. In agreement with previous works [28, 29], we
385 confirmed that this C83 was derived from α-secretase-
386 mediated cleavage of C99, since the α-secretase inhibitor

GI254023X (Gi) led to a virtually complete decrease of
D6-induced C83 with a concomitant increase in C99
levels (Fig. 1d, e). Besides the strong effect of γ-
secretase-inhibition on the levels of C99 and C83, more
surprisingly, analysis of EV contents also unraveled the
presence of various high molecular weight (HMW) APP-
CTF immunoreactivities (around 20-, 22-, 25-, 30- and
40 kDa, respectively) (Fig. 1c). These APP-CTFs were
observed in vesicles from D6-treated SH-C99 cells but
not from mock-transfected cells (not shown), indicating
that they were directly linked to C99. The levels of
HMW APP-CTFs were very high in EVs, while they
were hardly detectable in cell homogenates, in which
C99 and C83 were the predominant species (Fig. 1c, f).
Nevertheless, when higher protein loads were analyzed
(Fig. 1f), HMW APP-CTFs could also be detected in D6-
treated cell lysates, indicating that the formation of these
APP-CTFs, at least partly, originate from intracellular
compartments. The presence of HMW APP-CTF species
of different sizes suggested that they could correspond
to oligomeric APP-CTFs of different compositions. In
agreement with this hypothesis, the treatment with the
α-secretase inhibitor Gi reduced the levels of the HMW
band around 20 kDa (thus probably composed of C83)
and concomitantly increased the band around 25 kDa
(thus probably containing C99) (Fig. 3d). Furthermore,
also in EVs, only part of the APP-CTF immunoreactivi-
ties was detected with the N-terminal directed antibody
WO-2 (Fig. 1g), which recognizes C99 but not C83
(compare labeling in Fig. 1f and Fig. 1g). Finally, to con-
firm the presence of HMW APP-CTFs in cells, in which
C99 is not directly expressed but produced from APP,
we also purified EVs secreted from SH-SY5Y cells stably
expressing APP^{swe} (Fig. 1h). Also in these cells, D6-
treatment unraveled EVs containing not only C99 and
C83 monomers but also HMW APP-CTFs, which levels
again were low and almost undetectable in homogenates
of cells.

387 **The treatment of SH-C99 cells with the inhibitor of** 388 **exosomal production and secretion GW4869 leads to** 389 **increased levels of intracellular high molecular weight** 390 **APP-CTFs**

391 The above described data indicated a high content of
392 APP-CTFs in EVs and suggested that many of these EVs
393 could correspond to exosomes. Exosome production is
394 dependent on the conversion of sphingomyelin into cer-
395 amide by neutral sphingomyelinase (nSMase) [30]. Thus,
396 to strengthen our hypothesis, we assumed that GW4869
397 an inhibitor of nSMases should affect cellular HMW
398 APP-CTF levels and immunological profile and mimic
399 those observed in EVs. Indeed, the treatment of SH-C99
400 cells with GW4869 (GW) led to increased intracellular
401 levels of D6-induced HMW APP-CTFs (Fig. 1i, k), the



f1.3
f1.4
f1.5

f1.6 (See figure on previous page.)

f1.7 **Fig. 1** EVs from γ -secretase inhibitor-treated C99 expressing SH-5YSY are enriched in high molecular weight APP-CTFs. a-c EVs were purified from
 f1.8 media of vehicle- or D6-treated SH-C99 cells and validated by NTA (a) and electron microscopy (EM) (b) and immunoblot analysis of exosomal
 f1.9 markers (c). a-b Both NTA and EM revealed the presence of vesicles having a mean size around 100 nm in both conditions. c. Immunoblots
 f1.10 showed the presence of the exosomal markers Hsc70, Alix, Flotilin2 and Tsg101 and the absence of the reticular marker Calnexin. c The same
 f1.11 immunoblots were used to detect APP-CTFs. Arrows point to distinct high molecular weight (HMW) immunoreactivities revealed with α -APPct.
 f1.12 d-e SH-C99 cells were treated or not with D6 and with or without the α -secretase inhibitor G1254023X (Gi), and intracellular APP-CTF levels were
 f1.13 analyzed by immunoblot. The same blot is illustrated at low (low) and high (high) exposure. Bars in (e) correspond to the levels of C99 and C83,
 f1.14 as normalized to the levels in D6-treated cells. Data represent means \pm SEM, *** p < 0.001 as analyzed by the Mann Whitney U-test. f-g APP-CTFs
 f1.15 were detected in EVs or cell lysates (cells) using the α -APPct antibody (f) or the N-terminal directed antibody WO-2 (g). Arrows point to HMW
 f1.16 immunoreactivities. Note that some of the immunoreactivities revealed with α -APPct (particularly at the red arrow) were not detected with WO-2.
 f1.17 h APP-CTFs were detected by immunoblot in EVs or whole lysates (cells) of vehicle- or D6-treated SH-5YSY-APP^{swedish} cells using α -APPct. Arrows
 f1.18 point to HMW-APP-CTFs. Low and high correspond to low or high exposures. i-k SH-C99 cells treated or not with D6 and with or without
 f1.19 GW4869 (GW) were analyzed for APP-CTF levels by immunoblot using the α -APPct antibody. The same blot is illustrated at low (low) and high
 f1.20 (high) exposure. Arrows point to HMW. Bars in (j and k) correspond to the quantification of C99 and C83 (j) or HMW immunoreactivities (k), as
 f1.23 normalized to the levels in D6-treated cells. Data represent means \pm SEM, * p < 0.05 as analyzed by the Mann Whitney U-test
 f1.24

440 electrophoretic profile of which resembled those de- 478
 441 tected in EVs, while monomeric APP-CTF levels 479
 442 remained almost unaffected (Fig. 1i, j). This observation 480
 443 supported our previous statement that HMW APP-CTFs 481
 444 at least partly, could originate from intracellular com- 482
 445 partments and correspond to exosomes. 483

446 **Purified EVs from C99-expressing animals are enriched in** 484
 447 **APP-CTFs and contain high molecular weight APP-CTFs,** 485
 448 **the levels of which are increased by γ -secretase inhibition** 486

449 Next, we sought to confirm the adequation between the 487
 450 above described observations from in vitro cultured cells 488
 451 and our previous immunohistochemical data on AAV- 489
 452 C99 mice revealing D6-induced increase in extracellular 490
 453 APP-CTF-like immunoreactivities [7]. Brain EVs from γ - 491
 454 secretase inhibitor- (D6) or vehicle-treated AAV-free or 492
 F2 455 AAV-C99 mice [7] (Fig. 2a-d) were purified according to 493
 456 a recently described protocol [25]. As seen for EVs se- 494
 457 creted from cultured cells, electron microscopy (Fig. 2a) 495
 458 and NTA (not shown) confirmed the presence of appro- 496
 459 priate sized and shaped vesicles for exosomes [26]. Fur- 497
 460 thermore, immunoblot analysis revealed the presence of 498
 461 several exosomal markers including Hsc70 and Flotilin-2 499
 462 (Fig. 2b). In AAV-free mice, immunoblot showed the 500
 463 presence of only endogenous C83 in both EVs and brain 501
 464 lysates (Fig. 2b), while both C99 and C83 were detected 502
 465 in tissue lysates of the AAV-C99 mice. As observed in 503
 466 cells, the levels of C83 were higher in C99-expressing mice 504
 467 than in the AAV-free mice, indicating that most of C83 505
 468 directly derives from C99 in AAV-C99 mice (Fig. 2b). 506
 469 Moreover, as described for EVs from cultured cells, C83 507
 470 was more abundant than C99 in EVs from both control 508
 471 and D6-treated AAV-C99 mice (Fig. 2b), suggesting that 509
 472 virtually full α -secretase-mediated conversion of C99 into 510
 473 C83 occurs within EVs. D6-treatment led to drastic en- 511
 474 hancement of APP-CTF levels in EVs (Fig. 2b). Indeed, 512
 475 the APP-CTF/Hsc70 ratios in EVs from AAV-C99-vehicle 513
 476 and AAV-C99-D6 mice were more than 60 and 500 times 514
 477 higher respectively, than the ratio in AAV-free EVs 515

478 (Fig. 2c). In comparison, in whole brain homogenates, the 479
 480 APP-CTF/Hsc70 ratios were only 2 times higher in AAV- 481
 482 C99-vehicle mice and 75 times higher in AAV-C99-D6 483
 484 mice, as compared to AAV-free mice (Fig. 2c, f (7,24) = 484
 485 97.83, p < 0,001; one-way ANOVA). Similarly, the APP- 485
 486 CTF/APP ratios were about 6 and 113 times higher 486
 487 in EVs from AAV-C99 vehicle-treated mice and D6- 487
 488 treated mice, respectively, than in EVs from AAV-free 488
 489 mice (Fig. 2d). Again, in whole brain homogenates, 489
 490 APP-CTF/APP ratios were only 2 and 30 times higher 490
 491 in vehicle- and D6-treated AAV-C99 mice, respect- 491
 492 ively, than in AAV-free mice (Fig. 2d, f (7,24) = 24.77, 492
 493 one-way ANOVA)). Overall, this set of data indicated 493
 494 that D6 treatment led to the secretion of strongly 494
 495 APP-CTF-enriched EVs in AAV-C99 mice. Moreover, 495
 496 as observed in SH-C99 cells, immunoblot also revealed 496
 497 the presence of HMW APP-CTF immunoreactivities in 497
 498 EVs purified from AAV-C99 mice, the levels of which 498
 499 were also further increased in EVs from D6-treated mice 499
 500 (Fig. 2b). The HMW species were totally absent in AAV- 500
 501 free mice and thus directly linked to C99 or its derived 501
 502 products such as C83. These findings were also confirmed 502
 503 in EVs purified from 3xTgAD mouse brains in which C99 503
 504 is produced from overexpressed APP^{swedish} (Fig. 2e-g). 504
 505 Indeed, these mice also displayed extracellular APP-CTF 505
 506 associated staining that was restricted to the subiculum of 506
 507 D6-treated animals, the area accumulating C99 (Fig. 2e). 507
 508 Moreover, biochemical analysis of EVs purified from 508
 509 hippocampi revealed the presence of both monomeric 509
 510 (C83) and at least one HMW APP-CTF in D6-treated 510
 511 3xTgAD mice. This HMW APP-CTF had a size similar 511
 512 (about 20 kDa) to the most abundant HMW APP-CTFs 512
 513 observed in AAV-C99 mouse brains and probably corre- 513
 514 sponds to C83 homodimers (Fig. 2g). It is well known that 514
 515 once secreted, EVs can be taken up by neighbouring cells. 515
 516 Thus, in order to determine the fate of the neuronal- 516
 517 derived APP-CTF bearing EVs in our mouse models, we 517
 518 performed co-immunostaining on AAV-C99 mouse brain 518
 519 sections to detect APP-CTFs (with the APP antibody 519

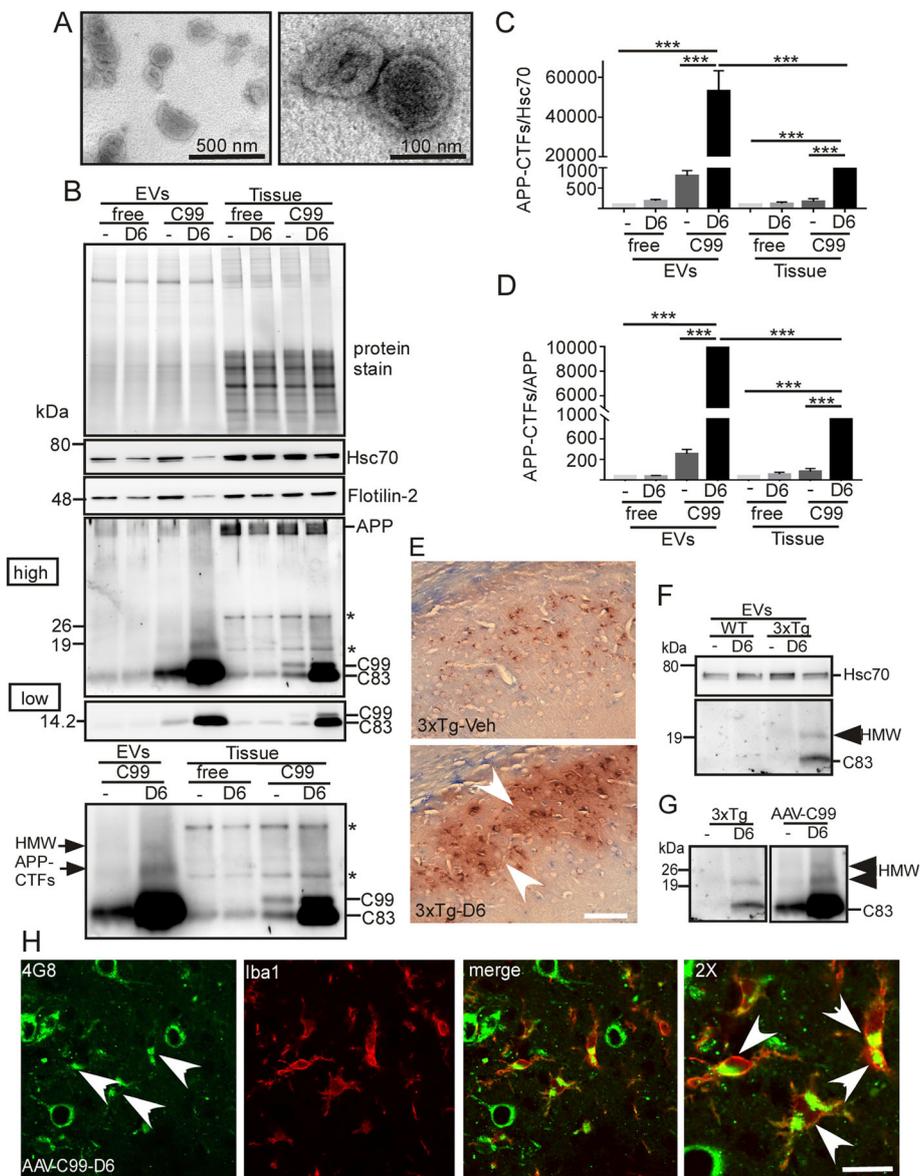


Fig. 2 EVs from γ -secretase inhibitor-treated AAV-C99 and 3xTgAD mice are enriched in APP-CTFs including high molecular weight APP-CTFs. **a-d** Brain EVs from 2 month-old vehicle- or D6-treated AAV-free or AAV-C99 mice were validated by electron microscopy (**a**) and immunoblot for the detection of the exosomal markers Hsc70 and Flotilin2 (**b**). **a** Ultramicrophotographs of vesicles purified from D6-treated AAV-C99 brain showed the presence of mainly vesicles with sizes around 100 nm. Bar scales correspond to 500 nm and 100 nm, respectively. **b-d** APP-CTFs in EVs and whole brain (tissue) were detected by immunoblot analysis. Proteins were stained by photoactivation using the Bio-Rad prestain method (protein stain) and immunoblots were used for the detection of APP-CTFs and exosomal markers (Hsc70 and Flotilin-2). The α -APPct antibody detected some non-specific immunoreactivities in tissue extracts (asterix). Low and high correspond to low or high exposures of the same immunoblot. The lower blot illustrates the presence of HMW APP-CTFs at higher magnification. Bars in **c-d** correspond to the levels of APP-CTFs in EVs or whole brain (Tissue) that were normalized to either endogenous Hsc70 (**c**) or full-length APP (**d**). Data represent means \pm SEM, * $p < 0.001$ as analyzed by 2-way ANOVA followed by Dunnett's posthoc analysis. **e** Brain sections of 5 month-old 3xTgAD vehicle- or D6-treated mouse were immunostained with 4G8 and microphotographs illustrates the staining at the level of the subiculum. Note the strong extracellular staining in the D6-treated mouse arrow heads. **f-g**, EVs were purified from hippocampi of vehicle- or D6-treated Wild-type (WT) and 3xTgAD mice and used for immunoblot analysis of APP-CTFs. Blots in (**g**) allow the comparison of the sizes of HMW APP-CTFs detected in 3xTgAD and AAV-C99 mouse brain vesicles. **h** Co-immunostaining of APP-CTFs with 4G8 (green) and α -Iba1 (red) on brain sections of D6-treated AAV-C99 animals. Arrows in the merged image point to APP-CTF positive microglia. Bar in e and h corresponds to 100 μ m and 10 μ m, respectively

517 4G8) and to depict microglial (Iba1 antibody) and astroglial (GFAP antibody) cells. Indeed, despite the fact that in our mouse model C99 expression is driven by the neuronal promoter synapsin, this analysis revealed the presence of multiple 4G8-immunostained Iba1-positive cells (Fig. 2h), suggesting that many of these APP-CTF bearing EVs were taken up by microglial cells. 4G8 immunostaining was not detected in GFAP positive cells (not shown), suggesting a lower uptake of these EVs in astroglia.

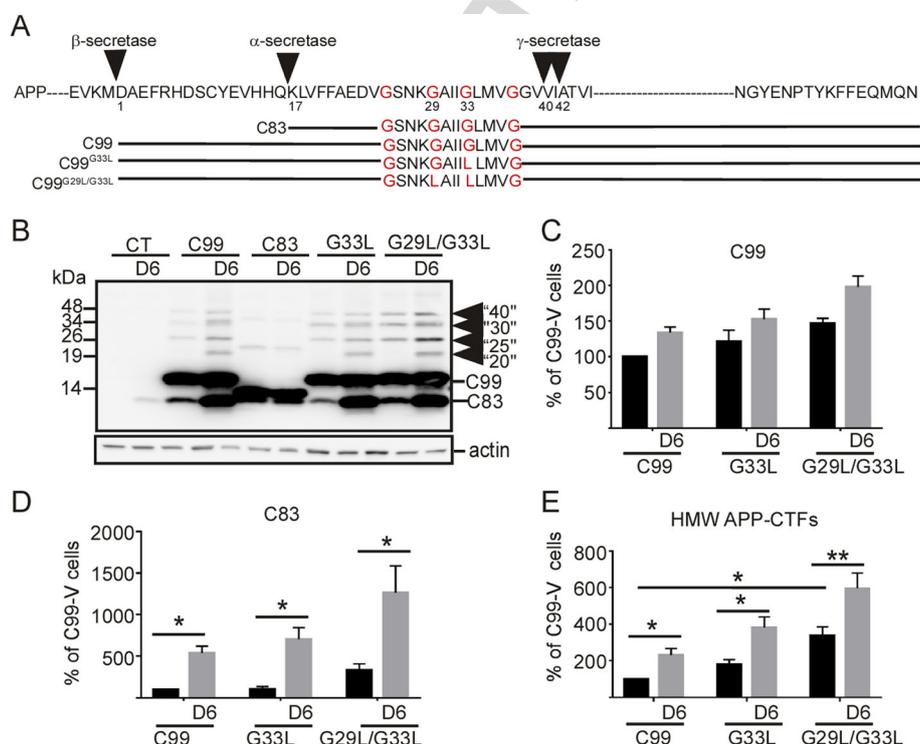
526 The dimerization C99 mutant favors the formation of high molecular weight APP-CTFs resembling those observed in D6-treated cells

527
528
529 The data obtained with the α -secretase inhibitor and immunological studies suggested that the HMW-APP-CTFs could correspond to oligomeric APP-CTFs. To further confirm this postulate, we generated two GXXXG C99 mutants, C99^{G33L} and C99^{G29L/G33L} previously proposed F3 to promote homodimerization [19] (Fig. 3a) and expressed them into HEK293 cells for high-yield gene expression. 535 Indeed, we observed that the expression of C99^{G29L/G33L} led to the detection of not only monomeric C99 but also of HMW APP-CTF immunoreactivities, while the effect

of C99^{G33L} on dimerization was low and not significantly different from control cells expressing C99 (Fig. 3b). Indeed, in HEK293 cells, the high expression of C99 was sufficient to induce the presence of HMW APP-CTFs, the levels of which however were found to be increased by D6-treatment (Fig. 3b). Furthermore, as it was the case for C99-expressing cells, mutant (C99^{G33L} and C99^{G29L/G33L}) expressing cells also displayed a high level of C83, indicating that these mutations did not alleviate susceptibility to α -secretase cleavage (Fig. 3b, d). Strikingly, the electrophoretic patterns in the mutant expressing cells fully mimicked those observed in D6-treated wild-type C99 expressing cells (Fig. 3b-e). Indeed, in both cases, immunoblots revealed a mix of distinct HMW APP-CTF immunoreactivities, thus reflecting a heterogeneous mix of dimers but also of oligomers composed of both C83 and C99.

536 Pharmacological blockade or genetic invalidation of γ -secretase unravels a distinct subcellular localization of monomeric and oligomeric APP-CTFs

537 Our data showing a selective enrichment of HMW APP-CTFs in EVs could originate from an initially distinct 540



f3.1 **Fig. 3** Mutations in the GXXXG motif in the transmembrane domain of C99 promote the formation of HMW APP-CTFs resembling those induced
f3.2 by D6-treatment. **a** shows a schematic representation of APP, C83, C99 and C99 dimerization mutant sequences used in this study. Glycines (G)
f3.3 substituted by leucines (L) are indicated in red. **b-e** HEK293 cells were transfected with empty vector (CT), C99, C83, C99^{G33L} or C99^{G29L/G33L}, and
f3.4 were treated with or without D6. Arrows point to the high molecular weight (HMW) APP-CTF immunoreactivities. Bars in **(c-e)** correspond to the
f3.5 levels of C99 **(c)**, C83 **(d)** and HMW APP-CTF **(e)** immunoreactivities, which in each case were normalized to the levels in vehicle-treated C99
f3.6 expressing cells. Data represent means \pm SEM, * p < 0.05, ** p < 0.01 as analyzed by 2-way ANOVA followed by Dunnett's posthoc analysis
f3.7

561 subcellular localization of monomeric APP-CTFs. Indeed,
562 immunofluorescence analysis of the SH-C99 cells used for
563 EV purifications revealed a distinct APP-CTF immuno-
F4 564 staining in vehicle and D6-treated cells (Fig. 4a-b). In ve-
565 hicle conditions (where almost all CTF species analysed
566 biochemically correspond to monomeric C99 and C83,
567 see Fig. 1), nearly all cells displayed a strong APP-CTF
568 staining localized to the perinuclear region typical of the
569 Golgi apparatus and to the ER (Fig. 4a, b). However, in
570 D6-treated SH-C99 cells (displaying monomeric but also
571 oligomeric APP-CTFs), the immunostaining appeared
572 strongly punctuate in almost all cells (Fig. 4a, b). Since
573 SH-5YSY cells, because of their small size, are not very ap-
574 propriate for subcellular analysis, we decided to use the
575 larger HeLa cells to more accurately delineate the respect-
576 ive intracellular localization of APP-CTF monomers and
577 oligomers (Fig. 4c-f). Also in untreated C99 expressing
578 HeLa cells, the APP-CTF staining was seen within the
579 perinuclear region typical of the Golgi apparatus and
580 found to co-localize with the *trans*-Golgi apparatus
581 marker, TGN46 (Fig. 4c). Conversely, in D6-treated cells
582 there was an almost complete quantitative shift from cells
583 displaying mostly “Golgi/ER” associated staining to those
584 displaying mostly punctuate staining (Fig. 4d, left panel,
585 Fig. 4f). In these cells, there was a strong overlap with
586 markers of early endosomes (Rab5-GFP), late endosomes
587 (Rab7-GFP) as well as lysosomes (Lamp1-GFP) (Fig. 4d)
588 indicating that the punctuate staining corresponded to a
589 mixture of organelles of the endosomal network. Overall,
590 this data suggested that monomers and HMW APP-CTFs
591 have a distinct subcellular localization, with monomers
592 mainly localized to the Golgi and ER and HMW species
593 to endosomes and lysosomes. In agreement, cells trans-
594 fected with the GXXXG mutant C99^{G29L-G33L} displayed a
595 mix of cells with endosomal/lysosomal-associated staining
596 and Golgi/ER associated staining even in absence of D6
597 and many cells displayed both Golgi and endolysosomal
598 staining (Fig. 4 e-f). To validate that the D6-associated
599 modulation of APP-CTF localization was genuinely linked
600 to the blockade γ -secretase activity, we performed similar
601 experiments in presenilin 1 and 2 invalidated cells (MEF
602 PS1/2^{-/-}), known to totally lack γ -secretase activity [23]
F5 603 (Fig. 5). Firstly, we confirmed a Golgi/ER associated APP-
604 CTF staining in about 95% of C99 transfected MEF-PS-
605 WT cells (Fig. 5a, c) and observed that these cells, when
606 treated with D6 or transfected with C99^{G29L/G33L}, dis-
607 played a more punctuate APP-CTF immunostaining and a
608 reduced staining in the Golgi (punctuate in about 80 and
609 50% of D6-treated and C99^{G29L/G33L} transfected cells,
610 respectively) (Fig. 5a, c). Next, we found that about
611 90% of C99 transfected MEF PS1/2^{-/-} cells displayed
612 a punctuate staining and no or very low Golgi associated
613 staining (Fig. 5a, c). Again, co-labeling with organelle
614 markers revealed the presence of APP-CTF-associated

immunoreactivity in early (Rab5-GFP) and late (Rab7- 615
GFP) endosomes, as well as in lysosomes (Lamp1-GFP) 616
(Fig. 5b). Accordingly, immunoblot revealed the higher 617
levels of HMW APP-CTFs in C99 transfected MEF 618
PS1/2^{-/-} as compared to C99-expressing MEF PS^{+/+} 619
cells (Fig. 5d). This data showed that both pharmaco- 620
logical blockade and genetic depletion of γ -secretase 621
yield HMW APP-CTFs species that are selectively as- 622
sociated to endosomal-lysosomal compartments. 623

D6-treatment reduces APP-CTF/SorLA physical interaction 624

Our data suggest that γ -secretase inhibition leads to 625
APP-CTF oligomers formation by preventing C99 cleav- 626
age, thereby increasing the concentrations of APP-CTFs. 627
This cleavage is thought to mainly occur within com- 628
partments of the endosomal network suggesting that 629
oligomer formation and accumulation take place within 630
these compartments. However it is also possible that a 631
defective APP-CTF trafficking could contribute to this 632
endolysosomal build-up of oligomeric APP-CTFs. Previ- 633
ous work demonstrated that C99, as it is the case for 634
APP, can bind to the sorting receptor SorLA [31], the 635
major regulator of subcellular shuttling of APP between 636
the TGN and endosomes [32, 33]. Thus, we hypothe- 637
sized that a defective interaction between SorLA and 638
APP-CTFs and thus altered APP-CTFs trafficking could 639
contribute to the accumulation of oligomers in the 640
endosomal network. Indeed, co-immunoprecipitation ex- 641
periments confirmed: 1) the ability of SorLA to phys- 642
ically interact with APP-CTF monomers, since SorLA was 643
co-immunoprecipitated with α -APPct antibodies in control 644
conditions (vehicle C99-expressing cells) (Fig. 6 645 F6
upper panel); 2) a full abolishment of SorLA co- 646
immunoprecipitation in D6-treated cells (Fig. 6a upper 647
panel). This set of data suggests that the physical inter- 648
action of APP-CTFs with SorLA could be hampered by 649
APP-CTF oligomerization, thus explaining the D6- 650
associated defect of retrograde transport to the TGN 651
leading to APP-CTF accumulation in all compartments 652
of the endosomal network including lysosomes and exo- 653
somes. This lack of interaction could be due to a lack of 654
APP-CTF oligomers to bind SorLA. However, it is also 655
possible that γ -secretase inhibition affects SorLA and 656
thus its ability to bind APP-CTFs, since SorLA is also a 657
well known substrate of γ -secretase [34] [35]. Indeed, 658
SorLA undergoes regulated intramembrane proteolysis 659
with a TACE1-mediated primary cleavage of SorLA yield- 660
ing a membrane-attached fragment that behaves as a 661
substrate of γ -secretase cleavage, referred to as SorLA- 662
CTF α [34, 35]. This was confirmed in our study, since a 663
low molecular weight immunoreactivity most likely cor- 664
responding to SorLA-CTF α accumulates in D6-treated 665
cells (Fig. 6a right middle panel and Fig. 6b). In agree- 666
ment, immunocytochemistry confirmed a particular 667

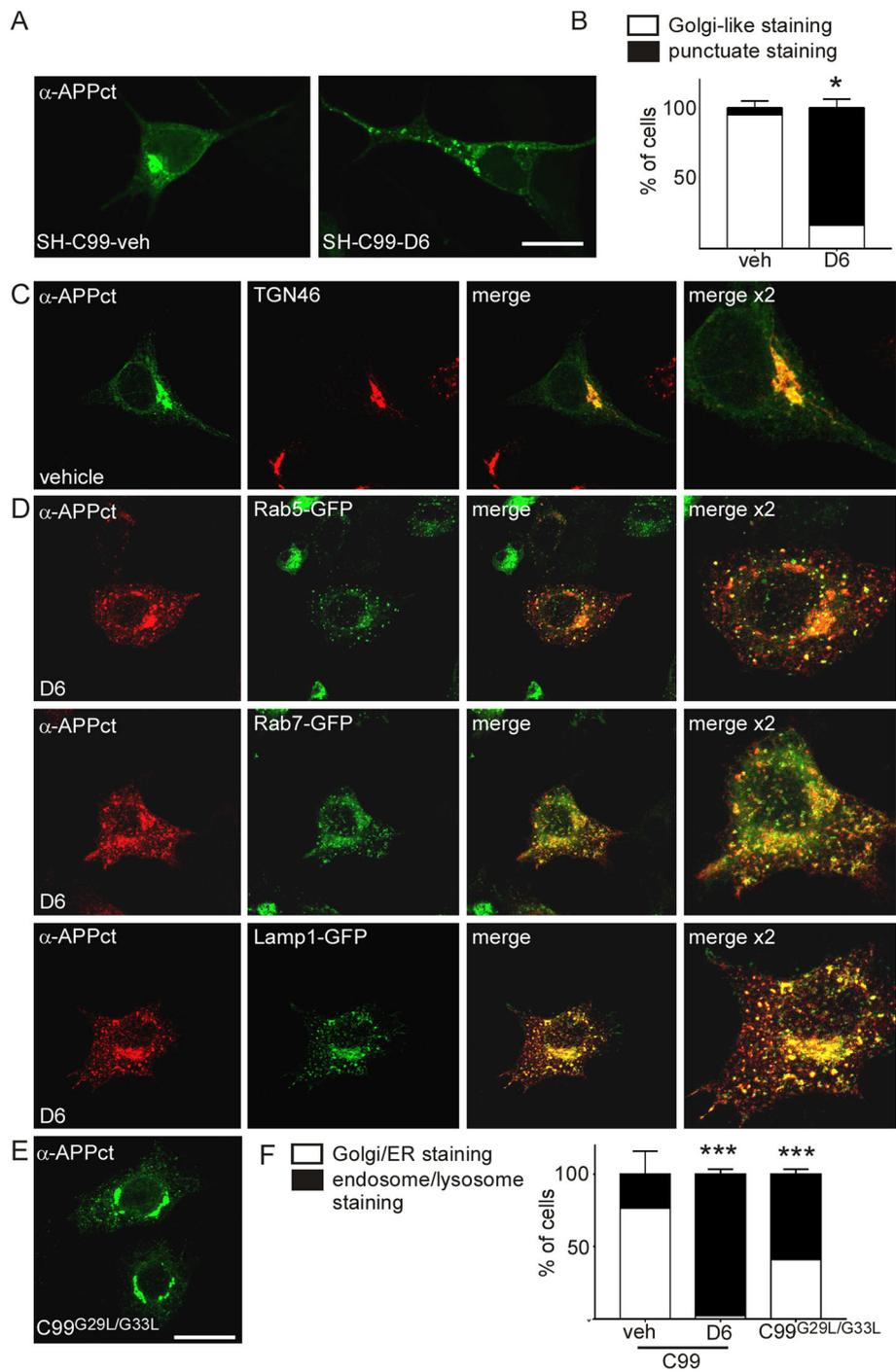


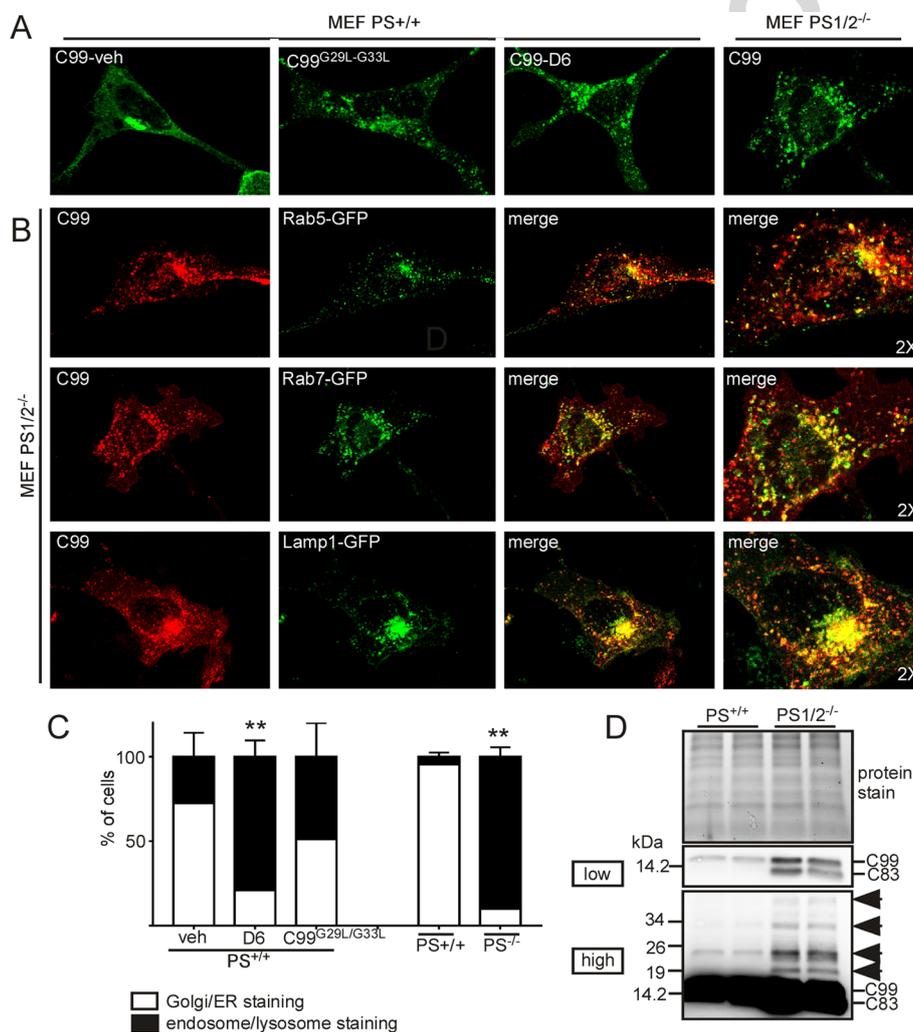
Fig. 4 (See legend on next page.)

f4.3
f4.4
f4.5

f4.6
f4.7
f4.8
f4.9
f4.10
f4.11
f4.12
f4.13
f4.14
f4.15
f4.16
f4.17
f4.18
f4.20
f4.21

(See figure on previous page.)

Fig. 4 The subcellular localization of APP-CTFs is different in vehicle- and D6-treated C99-expressing SH-SY5Y and HeLa cells. **a-b** SH-SY5Y cells stably expressing C99 (SH-C99) were treated with or without D6 and immunostained with α -APPct. **a** APP-CTF immunostaining revealed a strong perinuclear staining typical of the Golgi in vehicle-treated cells and a punctuate staining in D6-treated cells. Bars in b correspond to the quantification of cells having either Golgi-like or punctuate APP-CTF immunostaining. A total of 400 cells for each condition from 3 independent experiments were counted. Data represent means \pm SEM, $*p < 0.05$ as analyzed by the Mann Whitney U-test. **c-f** HeLa cells were transiently transfected with C99 and treated or not with D6 (**c, d** and **f**) or with C99^{G29L/G33L} (**e, f**). **c**, Vehicle-treated C99-expressing cells presented a strong degree of colocalization of C99 (green) and the *trans*-Golgi apparatus marker TGN46 (red). **d** In D6-treated cells, the APP-CTF immunostaining (red) was punctiform and there was a high degree of colocalization with the subcellular markers Rab5-GFP, Rab7-GFP or Lamp1-GFP (green). Right panels show 2-fold high magnification images. **e** Cells transfected with C99^{G29L/G33L} and APP-CTFs stained using α -APPct displayed a mix of Golgi-like and punctuate staining. **f** Bars correspond to the quantification of cells having either Golgi/ER or endosome/lysosome associated APP-CTF immunostaining. A total of 500 cells for each condition from 3 independent experiments were counted. Data represent means \pm SEM, $***p < 0.001$ as analyzed by 2-way ANOVA followed by Dunetts posthoc analysis



f5.1
f5.2
f5.3
f5.4
f5.5
f5.6
f5.7
f5.8
f5.9
f5.10

Fig. 5 The subcellular localization of APP-CTFs is different in PS^{+/+} and PS1/2^{-/-} MEF cells. **a** MEF PS^{+/+} cells transfected with C99 or C99^{G29L/G33L} and treated or not with D6, or MEF PS1/2^{-/-} cells were stained with α -APPct. Whereas vehicle-treated C99-transfected MEF PS^{+/+} cells presented Golgi-like staining, D6-treated cells, as well as C99^{G29L/G33L} expressing and PS1/2^{-/-} cells, displayed mainly punctuate staining. **b** MEF PS1/2^{-/-} cells were co-transfected with C99 and the intracellular markers Rab5-GFP, Rab7-GFP or Lamp1-GFP (green) and immunostained with α -APPct (red). The right panels show 2-fold high magnification of merged images. **c** Bars correspond to the quantification of cells having either Golgi/ER or endosome/lysosome associated APP-CTF immunostaining. A total of 400 cells for each condition from 3 independent experiments were counted. Data represent means \pm SEM, $***p < 0.001$ as analyzed by 2-way ANOVA followed by Dunetts posthoc analysis. **d** Immunoblot analysis of APP-CTFs in MEF PS^{+/+} and PS1/2^{-/-} cells. Proteins were stained by photoactivation using the Bio-Rad prestain method (protein stain) and immunoblots used for the detection of APP-CTFs. Arrows point to HMW immunoreactivities

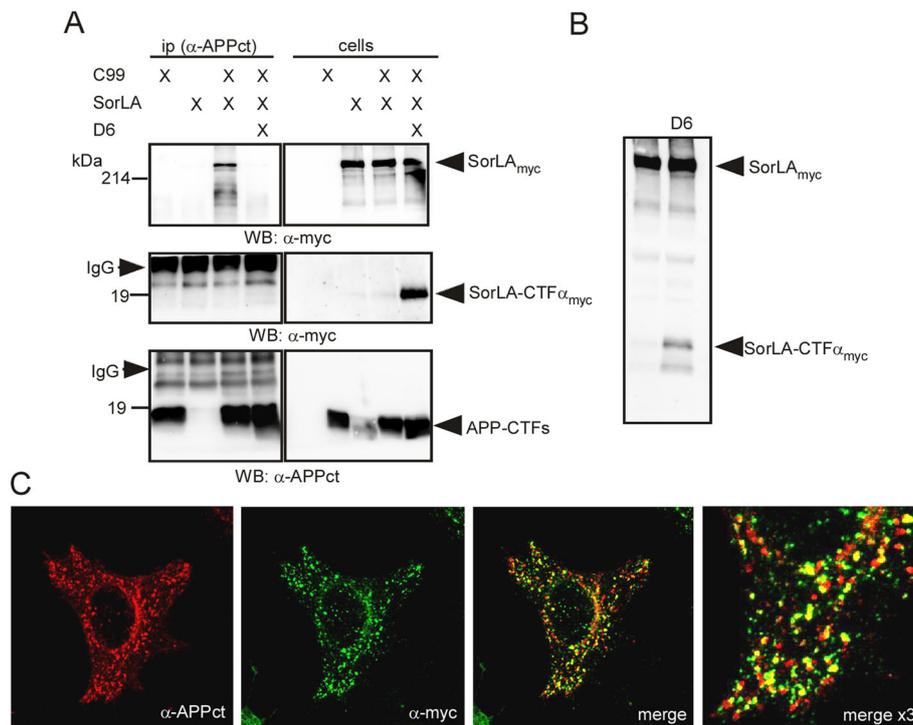


Fig. 6 D6-treatment abolishes APP-CTF/SorLA interaction and leads to SorLA-CTF α accumulation in the same intracellular compartments than APP-CTFs. **a** HEK-293 cells stably expressing C99 were transiently transfected with myc-tagged SorLA and treated or not with D6. SorLA was co-immunoprecipitated with α -APP-CTF antibodies only in vehicle treated cells (upper blot). The middle blot corresponds to the lower part of the immunoblot at higher exposure and reveals the presence of SorLA-CTF α in D6-treated cells. The lower blot corresponds to the same protein samples, but blotted with α -APPct, thus showing the levels of immunoprecipitated APP-CTFs. **b** Immunoblot analysis of SorLA_{myc} in cell lysates of vehicle- or D6-treated HEK-C99 cells revealed the presence of SorLA-CTF α -myc in D6-treated cells. **c** Immunocytochemistry of C99 (red) and SorLA_{myc} (green) in D6-treated co-transfected HeLa cells

668 strong overlap of SorLA and APP-CTF immunostainings
669 within endolysosomal compartments in γ -secretase in-
670 hibitory conditions (Fig. 6c). Thus, our data suggest that
671 a defective γ -secretase cleavage of both APP-CTF and
672 SorLA-CTF α could contribute to the accumulation of
F7 673 oligomeric APP-CTFs.

674 Discussion

675 Our previous work on the 3xTgAD and AAV-C99
676 mouse models showed that C99 accumulation was both
677 a cause and consequence of early lysosomal dysfunction
678 [7]. We found that the treatment of these animals with
679 the γ -secretase inhibitor D6 led to further increased
680 endolysosomal-associated APP-CTFs and to exacerbated
681 lysosomal-autophagic dysfunction [7]. Here we demon-
682 strate that γ -secretase inhibition also drastically in-
683 creases exosomal APP-CTF levels reflected by a diffuse
684 extracellular APP-CTF-associated immunostaining in
685 C99-accumulating brain areas, an anatomical observa-
686 tion that was supported by further biochemical analysis.
687 First, we confirmed the presence of both C99 and C83 in
688 purified EVs from both C99- and APP_{swe}-expressing cell
689 media and mouse brains, in agreement with previous

690 studies using purified EVs from cell media [17, 36], 690
691 [18, 37] or brain tissue from Tg2576 mice [25]. In 691
692 our models, most C83 was found to derive from α - 692
693 secretase-mediated cleavage of C99, since the treatment 693
694 with the α -secretase inhibitor GI254023X led to strongly 694
695 decreased C83 levels and concomitantly increased C99 695
696 levels. In agreement with previous works showing the 696
697 presence of the α -secretase ADAM10 in EVs [36, 38], this 697
698 cleavage was found to take place at least partly within exo- 698
699 somes, in which the C83/C99 ratio was even higher than 699
700 the same intracellular ratio. More surprisingly, purified 700
701 EVs from γ -secretase inhibitor-treated mice or cell media 701
702 not only displayed further increased C99 and C83 levels 702
703 but also HMW APP-CTF immunoreactivities, the levels of 703
704 which were very low in whole cell or brain homogenates. 704
705 These HMW APP-CTFs were found in cells expressing 705
706 C99, but not in control cells, indicating that they were di- 706
707 rectly linked to C99 and not to other APP-cleavage prod- 707
708 ucts, such as the recently discovered CTF η [39, 40] 708
709 proposed to be present in exosomes [37]. Indeed, several 709
710 lines of independent data from pharmacological (α -secre- 710
711 tase inhibition), immunological (C- and N-terminal di- 711
712 rected and aggregate specific- antibodies) or genetic 712

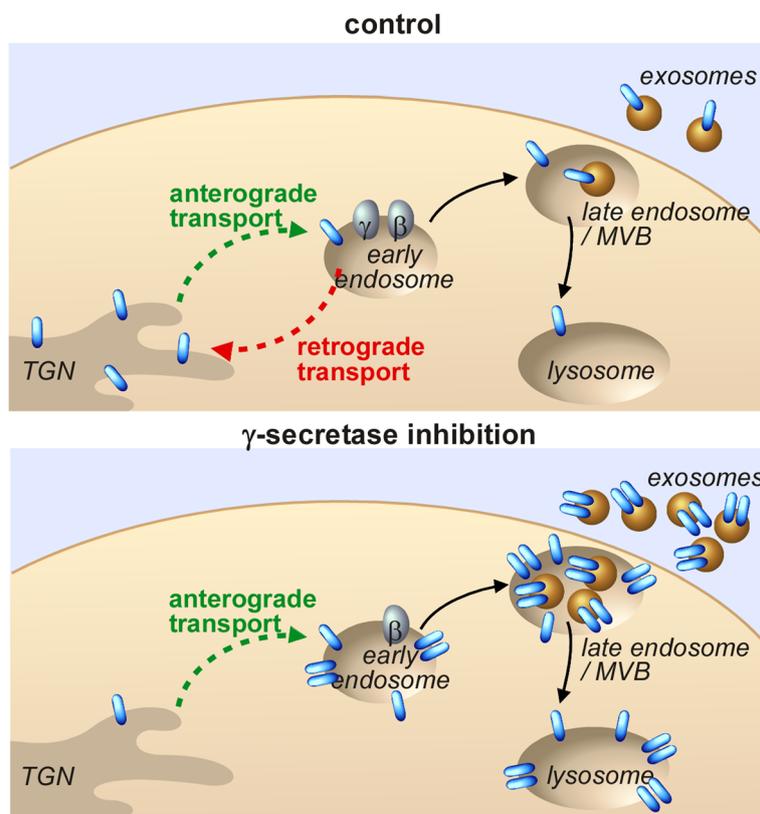


Fig. 7 Hypothetical model of oligomeric APP-CTF-enrichment in exosomes after γ -secretase inhibition. In control conditions, C99 (blue) monomers are trafficked between the TGN and endosomes and mainly accumulate in the Golgi. However, the inhibition of γ -secretase triggers the formation of higher levels of oligomeric APP-CTFs within endosomes, the main sites of γ -secretase cleavage. These oligomers poorly bind to SorLA, thus leading to a defect in their retrograde trafficking to the TGN and misdistribution to late endosomes, lysosomes as well as to the endosome-originating exosomes. γ and β corresponds to γ -secretase and β -secretase, respectively

Q57.1
f7.2
f7.3
f7.4
f7.5
f7.6

713 (GXXXG mutants and presenilin invalidation) approaches
714 indicated that these HMW APP-CTFs correspond to a
715 heterogenous mix of oligomeric APP-CTFs composed of
716 C99 and C83 homo- and hetero-oligomers. Indeed, in
717 agreement with a selective enrichment of HMW APP-
718 CTFs in exosomes, the treatment with the exosomal in-
719 hibitor GW4869 only slightly affected the intracellular
720 levels of monomers, but triggered a significant retention
721 of HMW APP-CTFs within cells. Furthermore, our
722 immunocytochemical analysis indicated that the selective
723 recovery of oligomers in exosomes was linked to their
724 mislocalization within the endolysosomal network. Indeed,
725 we found that monomers were localized mainly in the
726 TGN and ER, whereas oligomers were present in endoso-
727 mal and lysosomal compartments. It is well accepted that
728 γ -secretase cleavage mainly occurs within acidic compart-
729 ments of the endocytic pathway [12, 13]. Thus, γ -secretase
730 inhibition-induced oligomer formation most likely takes
731 place within these compartments explaining their specific
732 accumulation in endosomes, lysosomes as well as exo-
733 somes. However, in addition our data suggested that this
734 endolysosomal build-up was amplified due to defects in

APP-CTF trafficking in γ -secretase inhibitor conditions. 735
Both APP [41] and APP-CTFs [31] are trafficked between 736
the TGN and endosomes by means of sorting molecules 737
including SorLA (sortilin receptor with A-type repeats). 738
This trafficking is mediated via the C-terminal tail of 739
SorLA and its binding to cytosolic adaptor complexes, the 740
retromer (for retrograde transport) and Golgi-localized γ - 741
ear-containing ARF-binding proteins (GGAs) and AP1 742
and PACS1 (for anterograde transport) [41]. On one hand, 743
the disruption of retromer binding results in a retrograde- 744
sorting defect with accumulation of SorLA and thus APP 745
in endosomes and their depletion from the TGN. On the 746
other hand, the disruption of the GGA interaction in- 747
creases the levels of SorLA, and thus APP, in the TGN 748
[42]. Here, we showed that D6-treatment led to a strongly 749
reduced SorLA/APP-CTF interaction suggesting that a de- 750
fective retrograde transport of APP-CTF oligomers could 751
contribute to the endosomal HMW APP-CTF accumula- 752
tion. Accordingly, a recent paper showed that hippocam- 753
pal neurons from mice expressing the APP mutant Y682G 754
APP^{YG/YG}, that poorly interacts with SorLA, display strong 755
APP accumulation within late endosomes (LEs) and 756

lysosomes, ensuing functional alterations of the lysosomal system [43]. Here, we also found a strong lysosomal accumulation of APP-CTFs in D6-treated conditions, and previously showed that this APP-CTF accumulation could be a trigger of lysosomal and autophagic impairments [7]. Our data suggest that defects in APP-CTF trafficking is due to the fact that oligomeric APP-CTFs poorly bind SorLA. However, it should be noted that SorLA itself undergoes regulated intramembrane proteolysis (RIP) with an initial ectodomain shedding by α -secretase yielding SorLA-CTF α that undergoes subsequent γ -secretase-mediated hydrolysis generating SorLA-CTF γ (SorLA-ICD) [34, 35]. Indeed, D6 treatment led to the accumulation of SorLA-CTF α within the same intracellular compartments as APP-CTF oligomers suggesting that endosomal accumulation of SorLA-CTF α *per se* could affect SorLA function and APP-CTF trafficking. Whatever the exact mechanisms, our findings indicate that γ -secretase activity is critical for a correct APP-CTF trafficking, since the phenotype elicited by the pharmacological blockade of γ -secretase was strictly mimicked by the genetic depletion of presenilins that correspond to the catalytic core of the enzymatic complex [44, 45].

Previous *in vitro* data have indicated that C99 can dimerize [19], but our work is the first to demonstrate that APP-CTFs can also heterodimerize and form oligomers and to show the presence of oligomeric APP-CTFs *in vivo* in AD mouse models. We found that the GXXXG mutant C99^{G29L/G33L} mimics the γ -secretase inhibitor and blocks oligomeric APP-CTFs within compartments of the endosomal network. Probably a modified conformation of this mutant makes it more prone for dimerization, but the fact that dimers selectively accumulate in endosomes suggest that dimerization takes place within these compartments and indicates that oligomerization requires a particular biological environment (membrane lipid composition, pH etc). Indeed, previous works have shown that C99 dimerization is strongly affected by changes in both membrane thickness and lipid composition [46]. Thus taken together, our data indicate that APP-CTF oligomerization depends on the structural conformation of C99, the levels of γ -secretase activity and the intracellular localization, and propose that the targeting of APP-CTF oligomers to late endosomes, lysosomes and exosomes is also linked to a defective APP-CTF retrograde transport to the TGN. Oligomer misdistribution may well contribute to the previously described endolysosomal defects in mouse AD models [7, 8], as well as in human AD affected brains [47] or primary fibroblasts from individuals with Down Syndrome [9, 48]. Although our studies are based on overexpression models, the conclusions concerning endolysosomal accumulation of aggregated C99 are strengthened by recent works based on either isogenic

knockin human iPSCs modified by CRISPR/Cas9 or monogenic iPSCs carrying either APP or PS1 mutations, and which both demonstrate C99-mediated and A β -independent alterations of the endolysosomal network [49]. Whereas the paper of Kwart observed early endosomal dysfunction, the work from Hung and Livesey demonstrated lysosomal-autophagic pathology [6]. Similar findings were described by the group of Dr. Nixon using fibroblasts from Down's patients known to display an elevation of C99. These cells were also found to display defects in early endosomes [4, 50] as well as in lysosomal degradation [9]. Again, these alterations were found to be mediated by C99 and to be A β independent.

Interestingly, the data obtained in our study reconcile our immunohistochemical studies describing two distinct conformation- and localization-dependent APP-CTFs in our mouse models. Thus, *in situ*, only monomeric APP-CTFs localizing to the TGN and the ER, are recognized by C-terminal directed antibodies, whereas oligomerized and monomeric but oligomerization-prone APP-CTFs present in endosomes, lysosomes and exosomes, are detected with aggregate-specific antibodies but not with C-terminal antibodies.

Conclusions

This study is the first to demonstrate the presence of oligomeric APP-CTFs in *in vivo* AD mouse models and to show that their levels are strongly increased upon γ -secretase inhibition. We found that, unlike monomeric C99 that is mainly localized to the TGN, oligomeric APP-CTFs are mislocalized to compartments of the endosomal-lysosomal network including the endosomal-originating exosomes. Our findings open a novel view of APP-CTF related toxicity linked to their propensity to oligomerise and potentially spread via exosomes. The specific contribution of these oligomeric APP-CTF-bearing exosomes and their contribution to AD pathology remain to be established. Of note, our previous work unveiled pronounced C99-associated inflammatory stigmata in our mouse models [7]. Interestingly, we here found that a subset of neuron-derived EVs are taken up by microglia, the immune cells of the brain, providing an anatomical support to explain this neuroinflammation, although the definitive contribution of exosomal APP-CTFs in this process remains to be established. Indeed, microglial uptake of pathogenic EVs could have several consequences. On the one hand, it can serve as a means for the clearance of toxic molecules, as it was proposed for A β [51]. On the other hand, microglial uptake can contribute to disease propagation by spreading toxic molecules, as proposed for hyperphosphorylated tau [52], and can also initiate neuroinflammation [53]. Future studies should allow determining the exact role of these APP-CTF bearing EVs in neuron to neuron and

864 neuron to glial cell propagation and thus AD disease
 865 progression. Finally, our findings indicating that γ -
 866 secretase inhibition amplifies the presence of EVs carry-
 867 ing particular APP-CTFs adds a new argument against a
 868 therapeutic strategy based on γ -secretase inhibition in
 869 AD. According to our observations, these inhibitors
 870 should amplify the load and exosomal spread of toxic
 871 APP-CTF species.

872 Abbreviations

873 AAV: adenoassociated virus; AD: Alzheimer's disease; APP: amyloid precursor
 874 protein; CTF: C-terminal fragment; DAB: 3,3-diaminobenzidine; EM: electron
 875 microscopy; ER: endoplasmic reticulum; EV: extracellular vesicle; Gi: a-secretase
 876 inhibitor G1254023X; GW: exosomal inhibitor GW4869; HEK: human
 877 embryonal kidney; HeLA: human epitheloid cervix carcinoma; HMW: high
 878 molecular weight; MEF: mouse embryonal fibroblasts; MVB: multivesicular
 879 body; nSMAse: neutral spingomyelinase; NTA: nanoparticle tracking analysis;
 880 PBS: phosphate buffered saline; PFA: paraformaldehyde; PS: presenilin; SH-
 881 C99: C99 expressing SH-SY5Y neuroblastoma; SorLA: sortilin receptor with
 882 A-type repeats; swe: Swedish mutation; Tg: transgenic; TGN: trans-Golgi
 883 network; WT: wild-type

884 Acknowledgments

885 We wish to thank Dr. Laferla for providing the 3xTgAD mouse, Elan
 886 Pharmaceuticals for ELND006, Dr. Fraser for the APPct antibody, Dr. St-
 887 Georges-Hypsof for the SorLAmyc construct and Dr. De Strooper for providing
 888 MEF P^{Swt} and P^{S1/2^{-/-}} cells. We also thank Mathilde Cohen-Tannoudji at the
 889 institute of myology in Paris for help in producing AAVs and Sophie Pagnotta
 890 at the center of microscopy in Nice for help with electron
 891 microscopy.collectors.

892 Authors' contributions

893 IL conceived and supervised the study. IL and AB performed most parts of
 894 experiments and data analysis. ABo generated stable cells lines and
 895 performed experiments with C99 mutants, RP performed the viral injection
 896 of neonatal mice, IL and FC wrote the paper. All authors read and
 897 contributed to critical reading of the paper. All authors read and approved
 898 the final manuscript.

899 Funding

900 This work has been developed and supported through the LABEX
 901 (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ
 902 (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to
 903 Alzheimer's disease) and by Fondation Alzheimer. A. Be and A. Bo were
 904 granted from DISTALZ.

905 Availability of data and materials

906 The datasets used and/or analysed during the current study available from
 907 the corresponding author on reasonable request.

908 Ethics approval and consent participate

909 All animal experimental procedures were in accordance with the European
 910 Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and local
 911 French legislation.

912 Consent for publication

913 Not applicable.

914 Competing interests

915 The authors declare that they have no competing interests.

916 Author details

917 ¹Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS-UMR7275, team
 918 labeled «Fondation pour la Recherche Médicale» et «Laboratoire d'excellence
 919 DistalZ», Université de Nice-Sophia-Antipolis, Sophia-Antipolis, France.
 920 ²Institut-Myologie, Paris, France.

Received: 10 August 2019 Accepted: 23 October 2019

921

922

References

1. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, Fraser P, St-George-Hyslop P, Le Thuc O, Espin V, et al. 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*. 2012;32:16243–16255a. 923–928
2. Hebert SS, Horre K, Nicolai L, Papadopoulou AS, Mandemakers W, Silahatoglu AN, Kauppinen S, Delacourte A, De Strooper B. Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:6415–20. 929–933
3. Pera M, Alcolea D, Sanchez-Valle R, Guardia-Laguarta C, Colom-Cadena M, Badiola N, Suarez-Calvet M, Llado A, Barrera-Ocampo AA, Sepulveda-Falla D, et al. Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*. 2013;125:201–13. 934–936
4. Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A, Rigoglioso A, Jiang Y, Nixon RA. Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP-betaCTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2016;21:707–16. 937–940
5. Pulina M, Hiopkins M, Haroutunian V, Greengard P, Bustos V: C99, not beta-amyloid, is associated with selective death of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *bioRxiv* 2019. 941–944
6. Hung COY, Livesey FJ. Altered gamma-Secretase processing of APP disrupts lysosome and Autophagosome function in monogenic Alzheimer's disease. *Cell Rep*. 2018;25:3647–60 e3642. 945–946
7. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M, Lacor P, Klein W, Bauer C, Checler F. Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol*. 2016;132:257–76. 947–950
8. Kaur G, Pawlik M, Gandy SE, Ehrlich ME, Smiley JF, Levy E. Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry*. 2016;22:981–9. 951–955
9. Ying J, Sato Y, Im E, Berg M, Bordini M, Darji S, Kumar A, Mohan PS, Bandyopadhyay U, Diaz A, et al. Lysosomal dysfunction in Down syndrome is APP-dependent and mediated by APP-betaCTF (C99). *J Neurosci*. 2019. 956–958
10. Goutagny R, Gu N, Cavanagh C, Jackson J, Chabot JG, Quirion R, Krantic S, Williams S. Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before Abeta overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease. *Eur J Neurosci*. 2013;37:1896–902. 959–962
11. Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, Bauer C, Checler F, Pardossi-Piquard R. Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice. *Neurobiol Aging*. 2018;71:21–31. 963–966
12. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S. Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2012;2:a006270. 967–968
13. Sannerud R, Esselens C, Ejsmont P, Mattered R, Rochin L, Tharakeswar AK, De Baets G, De Wever V, Habets R, Baert V, et al. Restricted location of PSEN2/gamma-Secretase determines substrate specificity and generates an intracellular Abeta Pool. *Cell*. 2016;166:193–208. 969–972
14. Denzer K, Kleijmeier MJ, Heijnen HF, Stoorvogel W, Geuze HJ. Exosome: from internal vesicle of the multivesicular body to intercellular signaling device. *J Cell Sci*. 2000;113(Pt 19):3365–74. 973–975
15. Rajendran L, Honsho M, Zahn TR, Keller P, Geiger KD, Verkade P, Simons K. Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006;103:11172–7. 976–978
16. Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1995;65:1431–44. 979–980
17. Vingtdoux V, Hamdane M, Loyens A, Gele P, Drobeck H, Begard S, Galas MC, Delacourte A, Beauvillain JC, Buee L, Sergeant N. Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J Biol Chem*. 2007;282:18197–205. 981–984
18. Miranda AM, Lasiecka ZM, Xu Y, Neufeld J, Shahriar S, Simoes S, Chan RB, Oliveira TG, Small SA, Di Paolo G. Neuronal lysosomal dysfunction releases exosomes harboring APP C-terminal fragments and unique lipid signatures. *Nat Commun*. 2018;9:291. 985–988
19. Kienlen-Campard P, Tasiaux B, Van Hees J, Li M, Huysseune S, Sato T, Fei JZ, Aimoto S, Courtney PJ, Smith SO, et al. Amyloidogenic processing but not 989–990

Q6

Q3

- 991 amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production
992 requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane
993 GXXYG motifs. *J Biol Chem.* 2008;283:7733–44.
- 994 20. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R,
995 Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla FM. Triple-transgenic model of
996 Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and
997 synaptic dysfunction. *Neuron.* 2003;39:409–21.
- 998 21. Brigham E, Quinn K, Kwong G, Willits C, Goldbach E, Motter R, Lee M, Hu K,
999 Wallace, Kholodenko D, et al: pharmacokinetic and pharmacodynamic
1000 investigation of ELND006, a novel APP-selective gamma-secretase inhibitor,
1001 on amyloid concentrations in the brain, CSF and plasma of multiple
1002 nonclinical species following oral administration. International Conference
1003 on Alzheimer's Disease 2010.
- 1004 22. Oules B, Del Prete D, Greco B, Zhang X, Lauritzen I, Sevalle J, Moreno S,
1005 Paterlini-Brechot P, Trebak M, Checler F, et al. Ryanodine receptor blockade
1006 reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse
1007 model of Alzheimer disease. *J Neurosci.* 2012;32:11820–34.
- 1008 23. Herreman A, Serneels L, Annaert W, Collen D, Schoonjans L, De Strooper B.
1009 Total inactivation of gamma-secretase activity in presenilin-deficient
1010 embryonic stem cells. *Nat Cell Biol.* 2000;2:461–2.
- 1011 24. Lambert MP, Velasco PT, Chang L, Viola KL, Fernandez S, Lacor PN, Khuon D,
1012 Gong Y, Bigio EH, Shaw P, et al. Monoclonal antibodies that target
1013 pathological assemblies of Abeta. *J Neurochem.* 2007;100:23–35.
- 1014 25. Perez-Gonzalez R, Gauthier SA, Kumar A, Levy E. The exosome secretory
1015 pathway transports amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments from
1016 the cell into the brain extracellular space. *J Biol Chem.* 2012;287:43108–15.
- 1017 26. Hessvik NP, Llorente A. Current knowledge on exosome biogenesis and
1018 release. *Cell Mol Life Sci.* 2018;75:193–208.
- 1019 27. Thery C, Witwer KW, Aikawa E, Alcaraz MJ, Anderson JD, Andriantsitohaina
1020 R, Antoniou A, Arab T, Archer F, Atkin-Smith GK, et al. Minimal information
1021 for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018): a position statement
1022 of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the
1023 MISEV2014 guidelines. *J Extracell Vesicles.* 2018;7:1535750.
- 1024 28. Jager S, Leuchtenberger S, Martin A, Czirr E, Wesselowski J, Dieckmann M,
1025 Waldron E, Korth C, Koo EH, Heneka M, et al. alpha-secretase mediated
1026 conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99
1027 to C83 limits Abeta generation. *J Neurochem.* 2009;111:1369–82.
- 1028 29. Flammang B, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Debayle D, Dabert-Gay AS,
1029 Thevenet A, Lauritzen I, Checler F. Evidence that the amyloid-beta protein
1030 precursor intracellular domain, AICD, derives from beta-Secretase-generated
1031 C-terminal fragment. *J Alzheimers Dis.* 2012;30:145–53.
- 1032 30. Trajkovic K, Hsu C, Chiantia S, Rajendran L, Wenzel F, Schwillke P,
1033 Brugger B, Simons M. Ceramide triggers budding of exosome vesicles into
1034 multivesicular endosomes. *Science.* 2008;319:1244–7.
- 1035 31. Spoelgen R, von Arnim CA, Thomas AV, Peltan ID, Koker M, Deng A, Irizarry
1036 MC, Andersen OM, Willnow TE, Hyman BT. Interaction of the cytosolic
1037 domains of sorLA/LR11 with the amyloid precursor protein (APP) and beta-
1038 secretase beta-site APP-cleaving enzyme. *J Neurosci.* 2006;26:418–28.
- 1039 32. Willnow TE, Petersen CM, Nykjaer A. VPS10P-domain receptors - regulators
1040 of neuronal viability and function. *Nat Rev Neurosci.* 2008;9:899–909.
- 1041 33. Willnow TE, Andersen OM. Sorting receptor SORLA—a trafficking path to
1042 avoid Alzheimer disease. *J Cell Sci.* 2013;126:2751–60.
- 1043 34. Bohm C, Seibel NM, Henkel B, Steiner H, Haass C, Hampe W. SorLA signaling
1044 by regulated intramembrane proteolysis. *J Biol Chem.* 2006;281:14547–53.
- 1045 35. Nyborg AC, Ladd TB, Zwizinski CW, Lah JJ, Golde TE. Sortilin, SorCS1b, and
1046 SorLA Vps10p sorting receptors, are novel gamma-secretase substrates. *Mol*
1047 *Neurodegener.* 2006;1:3.
- 1048 36. Sharples RA, Vella LJ, Nisbet RM, Naylor R, Perez K, Barnham KJ, Masters CL,
1049 Hill AF. Inhibition of gamma-secretase causes increased secretion of
1050 amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with
1051 exosomes. *FASEB J.* 2008;22:1469–78.
- 1052 37. Laulagnier K, Javalet C, Hemming FJ, Chivet M, Lachenal G, Blot B,
1053 Chatellard C, Sadoul R. Amyloid precursor protein products concentrate in a
1054 subset of exosomes specifically endocytosed by neurons. *Cell Mol Life Sci.*
1055 2018;75:757–73.
- 1056 38. Kowal J, Arras G, Colombo M, Jouve M, Morath JP, Primdal-Bengtson B,
1057 Dingli F, Loew D, Tkach M, Thery C. Proteomic comparison defines novel
1058 markers to characterize heterogeneous populations of extracellular vesicle
1059 subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016;113:E968–77.
- 1060 39. Baranger K, Marchalant Y, Bonnet AE, Crouzin N, Carrete A, Paurmier JM, Py
1061 NA, Bernard A, Bauer C, Charrat E, et al. MTS-MMP is a new pro-amyloidogenic
1062 proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic
1063 mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci.* 2015;73:217–36.
- 1064 40. Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S,
1065 Hornburg D, Evans LD, Moore S, Daria A, et al. eta-Secretase processing of
1066 APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature.* 2015;526:443–7.
- 1067 41. Nielsen MS, Gustafsen C, Madsen P, Nyengaard JR, Herrey G, Bakke O, Mari
1068 M, Schu P, Pohlmann R, Dennes A, Petersen CM. Sorting by the cytoplasmic
1069 domain of the amyloid precursor protein binding receptor SorLA. *Mol Cell*
1070 *Biol.* 2007;27:6842–51.
- 1071 42. Dumanis SB, Burgert T, Caglayan S, Fuchtbauer A, Fuchtbauer EM, Schmidt V,
1072 Willnow TE. Distinct functions for anterograde and retrograde sorting of
1073 SORLA in Amyloidogenic processes in the brain. *J Neurosci.* 2015;35:12703–13.
- 1074 43. La Rosa LR, Perrone L, Nielsen MS, Calissano P, Andersen OM, Matrone C. Y682G
1075 mutation of amyloid precursor protein promotes Endo-Lysosomal dysfunction
1076 by disrupting APP-SorLA interaction. *Front Cell Neurosci.* 2015;9:109.
- 1077 44. De Strooper B, Saffig P, Craessaerts K, Vanderstichele H, Guhde G, Annaert
1078 W, Von Figura K, Van Leuven F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the
1079 normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature.* 1998;391:387–90.
- 1080 45. Checler F. Presenilins: structural aspects and posttranslational events. *Mol*
1081 *Neurobiol.* 1999;19:255–65.
- 1082 46. Audagnotto M, Lemmin T, Barducci A, Dal Peraro M. Effect of the synaptic
1083 plasma membrane on the stability of the amyloid precursor protein
1084 Homodimer. *J Phys Chem Lett.* 2016;7:3572–8.
- 1085 47. Cataldo AM, Hamilton DJ, Barnett JL, Paskevich PA, Nixon RA. Abnormalities
1086 of the endosomal-lysosomal system in Alzheimer's disease: relationship to
1087 disease pathogenesis. *Adv Exp Med Biol.* 1996;389:271–80.
- 1088 48. Cataldo AM, Petanceska S, Peterhoff CM, Terio NB, Epstein CJ, Villar A,
1089 Carlson EJ, Staufenbiel M, Nixon RA. App gene dosage modulates
1090 endosomal abnormalities of Alzheimer's disease in a segmental trisomy 16
1091 mouse model of Down syndrome. *J Neurosci.* 2003;23:6788–92.
- 1092 49. Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy E, Paquet D, Duffield M, Fak J, Olsen
1093 O, Darnell R, Tessier-Lavigne M. A large panel of isogenic APP and PSEN1
1094 mutant human iPSC neurons reveals shared Endosomal abnormalities
1095 mediated by APP beta-CTFs, not Abeta. *Neuron.* 2019;104:1–15.
- 1096 50. Jiang Y, Mullaney KA, Peterhoff CM, Che S, Schmidt SD, Boyer-Boiteau A,
1097 Ginsberg SD, Cataldo AM, Mathews PM, Nixon RA. Alzheimer's-related
1098 endosome dysfunction in Down syndrome is Abeta-independent but
1099 requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A.*
1100 2010;107:1630–5.
- 1101 51. Yuyama K, Sun H, Mitsutake S, Igarashi Y. Sphingolipid-modulated exosome
1102 secretion promotes clearance of amyloid-beta by microglia. *J Biol Chem.*
1103 2012;287:10977–89.
- 1104 52. Asai H, Ikezu S, Tsunoda S, Medalla M, Luebke J, Haydar T, Wolozin B,
1105 Butovsky O, Kugler S, Ikezu T. Depletion of microglia and inhibition of
1106 exosome synthesis halt tau propagation. *Nat Neurosci.* 2015;18:1584–93.
- 1107 53. Brites D, Fernandes A. Neuroinflammation and depression: microglia
1108 activation, Extracellular Microvesicles and microRNA Dysregulation. *Front*
1109 *Cell Neurosci.* 2015;9:476.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more biomedcentral.com/submissions



9.3 Résultats préliminaires et Perspectives

9.3.1 Étude du lien entre dysfonctionnement lysosomal-autophagique et exosomes

Comme le suggère la littérature, il semblerait y avoir un lien entre le dysfonctionnement lysosomal-autophagique et la sécrétion des exosomes. Il a été proposé qu'un dysfonctionnement du système lysosomal et/ou autophagique peut altérer à la fois le niveau de sécrétion exosomale, à la fois le contenu des exosomes. Dans l'article décrit précédemment, nous avons démontré que le contenu des exosomes est altéré dans des condition d'inhibition de la γ -sécrétase. Néanmoins, des résultats précédents de mon laboratoire montrent que ce traitement induit ou aggrave la pathologie lysosomale-autophagique liée au C99. Dans des études très préliminaires, nous avons donc cherché à caractériser les exosomes sécrétés par des SH-C99 suite à un traitement avec des inhibiteurs lysosomal ou autophagique : NH_4Cl qui empêche l'acidification des lysosomes et la bafilomycine A1 (Baf A1) qui a un double rôle, en bloquant la pompe V-ATPase et inhibant la fusion autophagosomes-lysosomes.

Étude des exosomes après traitement Dans cette partie du travail, nous avons purifié les exosomes sécrétés par les cellules SH-C99 suite à un traitement à la Baf A1. Tout d'abord, nous avons validé l'effet intracellulaire de ces drogues sur le C99 dans ce modèle (C99 surexprimé). En effet, la drogue augmente bien les niveaux de C99. Il est intéressant d'observer qu'à la différence du traitement au D6, la Baf A1 ne semble pas augmenter le C83 dérivé du C99. L'effet de cette drogues sur la sécrétion et le contenu des exosomes a ensuite été évalué. Ces premiers résultats suggèrent que l'inhibition de la V-ATPase (Baf A1) induit (1) une augmentation de la sécrétion exosomale, observée par l'augmentation des protéines totales (protéines marquées grâce aux gels "pré-stain") et de plusieurs marqueurs exosomaux (Figure 9.1 A) ainsi qu' (2) une modification du contenu des exosomes en APP-CTFs (Figure 9.1 B et C). En effet, ces exosomes sont enrichis en C99, en APPfl et également en APP-CTFs de haut poids moléculaires (bande à 30 kDa majoritairement), leur proportion semblent néanmoins différente de celles observée avec le traitement D6 (Figure 9.1 B). Plusieurs différences ont été notées : (1) une

des grandes différences avec le traitement D6 est l'augmentation importante de l'APPfl induite par la Baf A1, alors que l'inhibition de la γ -sécrétase avec le D6 ne modifie pas les niveaux d'APPfl (Figure 9.1 C), (2) contrairement au traitement D6, l'inhibiteur Baf A1 n'a pas d'effet sur les niveaux de C83 dans les exosomes ou les cellules, (3) le traitement avec la Baf A1 permet de révéler facilement la présence et un enrichissement d'AICD dans les exosomes, (4) une autre différence importante et non-discutée dans l'article concerne l'effet du D6 sur le taux de sécrétion exosomale. En effet, nous avons observé, de manière quasi-systématique, une baisse importante de la sécrétion exosomale en condition D6. Nous n'avons, à ce jour, pas encore élucidé les mécanismes permettant d'expliquer cet effet.

En ce qui concerne le traitement avec le NH₄Cl, les premiers résultats (1) montrent une forte baisse de la sécrétion exosomale (profil protéique total difficile à observer en "pré-stain") et (2) suggèrent un enrichissement des exosomes en APP-CTFs suite à l'inhibition lysosomale. En effet, le C99, C83 et certains des APP-CTFs de haut poids moléculaire sont observables dans la fraction exosomale issue de la condition NH₄Cl, malgré la très faible quantité de protéines totale. Ces résultats sont à reproduire pour confirmer ce profil. Pour expliquer cette différence, quant au niveau sécrétion entre le traitement NH₄Cl et BafA1, le Dr Miranda a suggéré que la BafA1 induirait une plus forte élévation du pH que le NH₄Cl, proposant ainsi l'importance de la vATPase (bloquer en condition BAF A1) dans la sécrétion des exosomes (MIRANDA et PAOLO, 2018).

Surexpression du TFEB dans des HEK293 surexprimant le C99 G33L/G29L Dans l'article 1 (6.2.2 Article en anglais) nous avons montré que la surexpression du TFEB induit une diminution des niveaux d'APP-CTFs *in vitro* et *in vivo*. Nous nous sommes donc demandés si le TFEB pouvait aussi induire la clairance des oligomères *in vitro*. Nous avons donc co-transfecté des HEK293 avec le mutant C99 G33L/G29L et le TFEB et étudié les niveaux d'APP-CTFs 48h après la transfection. Ces expériences montrent, de façon similaire au C99, une forte réduction des formes oligomériques d'APP-CTFs lors de la surexpression du TFEB. Le TFEB semble donc être une stratégie adaptée pour réduire à la fois les monomères mais aussi les oligomères de C99. Il serait donc intéressant de regarder la composition des exosomes des souris 3xTg-AD surexprimant le TFEB suite à l'injection d'AAV8-TFEB.

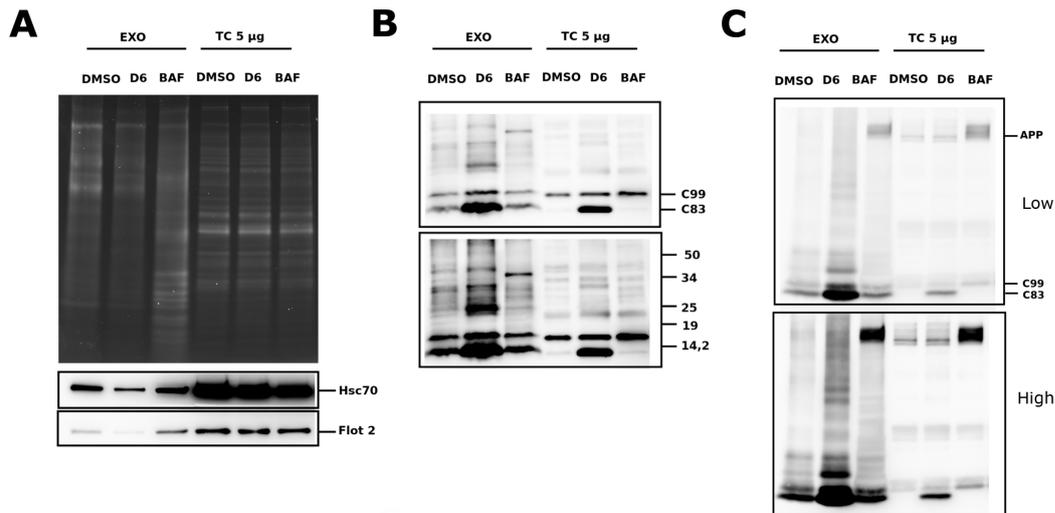


Figure 9.1.: Étude de la sécrétion et du contenu exosomal en APP-CTFs suite à un dysfonctionnement autophagique (Baf A1)

Analyse par immunoempreinte des exosomes sécrétés à partir de cellules SH-C99 traitées avec le D6 , la BafA1, ou le DMSO. (A) les gels prestain montrent une quantité plus élevée de protéines dans les exosomes des cellules traitées à la Baf A1 et moins élevée dans les cellules traitées au D6. Ces différences s’observent aussi après révélation avec des anticorps dirigés contre Hsc70 ou la Flotiline2 en immunoempreinte. (B et C) montrent les profils obtenus avec l’anticorps anti-APPct pour ces mêmes préparations d’exosomes sur gels (B) Tris-Tricine ou (C) Tris-Glycine 12%.

9.3.2 Exosomes, C99 et neuroinflammation ?

De façon logique, nous nous intéressons à présent à la potentielle toxicité des APP-CTFs, sous forme monomérique ou oligomériques, transportés par les exosomes. Des études très préliminaires suggèrent un rôle des microglies dans le devenir des APP-CTFs.

Présence d'APP-CTFs dans microglies mais pas dans astrocytes Dans l'article 2 ([9.2.2 Article en anglais](#)), nous avons démontré qu'une partie des exosomes neuronaux semble être capturée par les microglies. En effet, les images d'immunohistochimie révèlent un marquage des APP-CTFs au niveau des microglies (co-marquage avec le marqueur Iba1), alors que dans les modèles utilisés les APP-CTFs sont formés majoritairement dans les neurones (grâce aux promoteurs neuronaux (Thy1 pour le modèle 3xTg-AD et Syn pour le modèle AAV-C99). Au contraire, le co-marquage des APP-CTFs avec un marqueur astroglial (GFAP) n'a pas permis de révéler la présence des APP-CTFs dans ces cellules. La capture des exosomes enrichis en APP-CTFs par les microglies pourrait avoir plusieurs conséquences anti-nomiques : (1) favoriser la clairance des APP-CTFs, en surplus dans les neurones et/ou (2) induire une neuroinflammation et/ou (3) participer à la propagation de la pathologie. D'après les travaux précédents de l'équipe, la deuxième hypothèse semble la plus probable étant donné qu'une neuroinflammation est observée chez les souris AAV-C99, notamment après traitement avec le D6 (LAURITZEN et al., 2016). En ce sens, j'ai réalisé des premières analyses visant à comparer les niveaux de cytokines (qPCR) dans le cerveau de souris AAV10-C99 ou AAV10-Free. Enfin, d'autres études sont en cours pour comprendre, de façon large, le rôle des exosomes dans la neuroinflammation caractéristique de la MA.

En conclusion, ces premières analyses suggèrent un lien entre un dysfonctionnement lysosomal-autophagique et la sécrétion exosomale ainsi qu'un lien entre les exosomes et la neuroinflammation, ces deux dysfonctionnements étant observés dans la maladie d'Alzheimer. Le point commun entre ces mécanismes semblent être les APP-CTFs.

9.4 Contribution au projet

Dans ce projet, j'ai participé à la purification et à la caractérisation des exosomes dans les différents modèles cellulaires ainsi qu'à l'étude immunocytochimique ayant pour but de déterminer la localisation subcellulaire des APP-CTFs, présentés dans le papier. J'ai également participé aux analyses préliminaires visant à étudier le lien entre le dysfonctionnement lysosomal-autophagique et les exosomes ainsi que le lien entre les exosomes enrichis en APP-CTFs et la neuroinflammation.

Quatrième partie

Discussion et perspectives

” *The biology of AD is perhaps one of the most complex systematic malfunctions of the nervous system that we know. Indeed, for a disease with the prevalence and complexity of AD, the real surprise would be if there were in fact a single, linear pathway that led from healthy brain aging to AD*

— **Karl Herrup**
The Hong Kong University of Science and
Technology

Le but de cette discussion est d'une part de faire le lien entre les différentes parties de ce manuscrit et d'autre part d'intégrer les résultats obtenus pendant ma thèse dans un contexte plus général de la maladie d'Alzheimer, en discutant notamment des stratégies thérapeutiques actuelles ainsi que de la nécessité de biomarqueurs encore plus précoces. Mes travaux s'intègrent dans la continuité des découvertes de l'équipe, qui s'intéresse, de façon plus large, aux mécanismes physiopathologiques impliquées dans les maladies neurodégénératives (maladie d'Alzheimer et maladie de Parkinson principalement) ainsi qu'aux glioblastomes plus récemment. Mon projet marque également un tournant dans les recherches de l'équipe, s'intéressant à une stratégie "thérapeutique" visant le C99 ainsi qu'à l'étude de nouveaux acteurs dans la maladie d'Alzheimer, les exosomes.

Les APP-CTFs au cœur de la maladie d'Alzheimer

Dans la recherche sur la maladie d'Alzheimer, deux grands dogmes restent encore aujourd'hui ancrés : celui centré sur le peptide amyloïde opposant celui centré sur la protéine Tau. Une hypothèse a néanmoins essayé de réconcilier ces deux dogmes : l'hypothèse de la cascade amyloïde. Elle a placé pendant longtemps l'A β au centre des recherches sur la MA. Depuis plusieurs années, tenant compte des échecs cliniques visant ce peptide, certains chercheurs se sont tournés vers l'étude de nouveaux acteurs, potentiellement associés à la pathologie. C'est le cas de mon équipe, qui propose qui propose l'implication de d'autres catabolites issus du clivage amyloïdogénique de l'APP (C99, AICD, η -CTFs, A β tronqués...) dans les mécanismes physiopathologiques de la MA. Dans mon projet de thèse, je me suis concentrée sur le fragment C99 et sur ses dérivés, à savoir le C83 et les formes oligomériques du C99, que j'ai nommées pour simplifier APP-CTFs. Le C99 connaît un intérêt particulier ces dernières années dans l'étude de la MA, comme le montre le nombre croissant de publications en lien avec ce fragment.

10.1 Devenir du C99 et maladie d'Alzheimer

Le fragment C99, produit à partir du clivage de l'APP par la β -sécrétase (BACE1), n'a à ce jour aucun rôle physiologique défini. En condition physiologique, il est néanmoins très difficilement détectable, ce qui suggère son élimination rapide par la cellule. En effet, trois voies interconnectées participent à son élimination : soit son clivage par le complexe γ -sécrétase, soit sa dégradation par le système endosomal-lysosomal-autophagique, soit sa sécrétion en extracellulaire dans les exosomes. Cependant, dans le cas de la MA, plusieurs études montrent l'accumulation du C99 dans le cerveau des patients atteints de formes familiales ou sporadiques,

notamment au niveau de l'hippocampe et du cortex pré-frontal (PERA et al., 2013 ; S. KIM et al., 2016 ; PULINA et al., 2019).

Clivage par la γ -sécrétase

Comme décrit dans le chapitre 2 [Maturation physiopathologique de l'APP](#), la coupure du C99 par la γ -sécrétase a lieu au niveau de son domaine transmembranaire (site ϵ) et principalement dans les endosomes ou lysosomes, et de façon moindre à la membrane plasmique. Ce mécanisme fait intervenir différents acteurs et est nécessaire à la génération des peptides $A\beta$, ayant des rôles physiologiques notamment dans la plasticité synaptique et la survie du neurone. De ce fait et au regard de cette voie, le complexe γ -sécrétase est donc majoritairement reconnu comme une enzyme de production de l' $A\beta$. Mais, au vu des effets toxiques du C99, ne pourrait-on pas penser que la γ -sécrétase ait avant tout, un rôle d'enzyme de dégradation ? Cette fonction avait d'ailleurs été suggérée par Kopan et Llagan en 2004, proposant la γ -sécrétase comme un protéasome de la membrane (KOPAN et LLAGAN, 2004). En effet, ce complexe pourrait agir, en fonction du substrat, comme une enzyme permettant la génération de protéines impliquées dans la signalisation cellulaire (cas de Notch) ou au contraire comme une enzyme favorisant la dégradation de fragment toxique, comme ça pourrait être le cas pour le C99.

Dans la maladie d'Alzheimer, la majorité des formes familiales sont liées à des mutations sur les présénilines, et en particulier sur la PS1 portant l'activité catalytique de la γ -sécrétase (et plus rarement sur la PS2). L'étude des présénilines dans le contexte de cette maladie a donc connu un intérêt particulier. L'invalidation des présénilines dans des fibroblastes conduit non-seulement à une diminution de l' $A\beta$, mais également à une augmentation importante des niveaux d'APP-CTFs dans la cellule (DE STROOPER, 2007). De la même manière, il a été montré que la plupart des mutations FAD sur la PS1 augmente les niveaux d'APP-CTFs dans le cerveau (N. LI et al., 2016 ; DEYTS et al., 2019 ; KWART et al., 2019). Cependant, la majorité de ces études s'est concentrée essentiellement sur les effets des PS sur l' $A\beta$, délaissant le rôle que pourraient jouer les APP-CTFs. En effet, ces études montrent, de façon assez consistante, que la majorité des mutations sur la PS1 n'induisent pas de modification des niveaux totaux de l' $A\beta$ (ou alors une baisse), alors qu'elles augmentent le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ ainsi que la neurotoxicité. Un travail récent réalisé par le Dr Sannerud propose que ce phénomène serait induit par une modification de la localisation subcellulaire de la PS1 exprimée dans les FAD. Plus précisément, en condition normale, la PS1 est majoritairement localisée à la membrane plasmique

et est donc responsable de la production de l'A β sécrété en extracellulaire. Dans les formes mutées, la PS1 va être relocalisée dans les endosomes, où se situent normalement la PS2. À ce niveau, le clivage γ -sécrétase induit alors la production de formes plus longues et plus toxiques d'A β (A β_{42} notamment), qui s'expliquerait par une activité carboxypeptidase réduite dans les compartiments acides (SANNERUD et al., 2016).

Ces résultats ont été confirmés dans des neurones dérivés d'iPSC isogéniques par l'étude du Dr Kwart, montrant l'augmentation des formes longues d'A β dans les endosomes associés aux cellules exprimant les mutants *PSEN1*. De façon intéressante, cette étude montre également que l'ensemble des mutants testés conduit à l'augmentation du C99, mais sans modification des niveaux d'A β . Il propose donc le C99 comme cause du dysfonctionnement endolysosomal (KWART et al., 2019).

En conclusion, le rôle de la γ -sécrétase est donc incertain. Il est possible qu'elle soit à la fois nécessaire pour assurer la production de fragments physiologiques (dont A β), mais aussi primordiale pour la dégradation de fragments membranaires neurotoxiques (APP-CTFs). Enfin, nos résultats publiés dans le journal *Translational Neurodegeneration* montrent que l'inhibition de l'activité de la γ -sécrétase conduit également à la production de fragments transmembranaires potentiellement plus toxiques : les oligomères d'APP-CTFs (LAURITZEN et al., 2019). Outre les mutations sur *PSEN1*, certaines mutations FAD associées au gène *APP* sont également situées proches de la séquence du site ϵ , pouvant de la même manière affecter le clivage du C99 par la γ -sécrétase.

Dégradation par le système endolysosomal - autophagique

Comme précisé dans le paragraphe précédent, le C99 est produit dans les endosomes et lysosomes. De plus, en condition physiologique, une partie du C99 est également dégradée par les lysosomes, où les cathepsines jouent un rôle central dans cette dégradation. En effet, de nombreuses études *in vitro* ont montré que la dégradation de C99, et des APP-CTFs de façon plus large, est assurée par le système EAL (VINGTDEUX et al., 2007 ; BOLAND et al., 2010 ; TIAN et al., 2011 ; M. ASAI et al., 2011 ; H. WANG et al., 2015).

Cependant, cette dégradation du C99 est altérée dans la MA, en raison d'un dysfonctionnement à plusieurs niveaux du système EAL, conduisant probablement à l'accumulation du C99 dans le cerveau des patients. Ce phénotype EAL caractéristique est également retrouvé dans certains modèles murins de la MA, dont le

modèle 3xTg-AD. Chez les patients atteints de la MA, ce dysfonctionnement EAL est un marqueur précoce et quasi-systématique, que ça soit chez des patients atteints de formes familiales ou de formes sporadiques, et se développe bien avant les marqueurs histopathologiques plus classiques. De façon intéressante, beaucoup de gènes de susceptibilité associés à la survenue de la MA sont impliqués directement ou indirectement dans l'endocytose et/ou la dégradation lysosomale (PICALM, SORL1, BIN1, CSTB, CSTD etc), ce qui peut expliquer ces défauts (VAN ACKER et al., 2019). D'autre part, ce dysfonctionnement ne touche pas un seul mais plusieurs acteurs de la voie EAL (endosomes précoces et tardifs, lysosomes. . .), ce qui amplifie son effet délétère.

En accord avec l'étude réalisée dans les neurones iPSC et présentée ci-dessus, plusieurs études récentes ont aussi montré un lien entre le fragment C99 et ce dysfonctionnement EAL. Cet aspect sera abordé dans la suite de la discussion (voir [10.2 Toxicité des APP-CTFs dans la MA](#)). Enfin, mes travaux de thèse présentés dans l'article 1 ([6.2 Objectifs 1 et 2 – Article 1](#)) ont permis de montrer qu'une activation de la fonction lysosomale-autophagique permet de diminuer les niveaux de C99 dans un modèle de souris Alzheimer (3xTg-AD), renforçant à nouveau l'idée d'un lien pathologique entre le dysfonctionnement LA et le C99. Les avantages et les points faibles de cette stratégie seront discutés plus tard dans la discussion (voir [11.3 Activation de la dégradation lysosomale et autophagique](#)).

Sécrétion via les exosomes

En condition normale, les exosomes, qui sont des vésicules extracellulaires prenant naissance dans la voie endosomale (au niveau des corps multivésiculaires), participent au maintien de l'homéostasie cellulaire. En effet, ils permettent à la cellule de se décharger de protéines toxiques ou accumulées au niveau des endosomes. Dans le contexte de l'APP, seuls les fragments C83 et η -CTF ainsi que l'APPfl ont été décrits comme étant sécrétés en condition physiologique par les neurones corticaux et en association avec les exosomes (LAULAGNIER et al., 2018). Dans nos travaux, nous confirmons la présence de C83 exosomal dans les cerveau de souris sauvages. Au contraire, dans des conditions pathologiques mimant la MA *in vitro* ou *in vivo*, les exosomes sécrétés sont enrichis en C99 et C83 (VINGTDEUX et al., 2007 ; SHARPLES et al., 2008 ; LAULAGNIER et al., 2018 ; PEREZ-GONZALEZ et al., 2012). De plus, certaines études montrent également la présence de d'autres fragments de l'APP, comme l'AICD (VINGTDEUX et al., 2007 ; LAULAGNIER et al., 2018) ou l'A β (RAJENDRAN et ANNAERT, 2012). D'autre part, plusieurs études

indiquent que les exosomes contiennent également des protéines impliquées dans le métabolisme de l'APP (ADAM10, PS1, PS2, Nicastrine etc) proposant ainsi la contribution des exosomes dans le métabolisme de l'APP (PEREZ-GONZALEZ et al., 2012). Dans les travaux publiés dans l'article 2 (9.2 Article 2) présenté dans ce manuscrit, nous avons confirmé la présence et l'enrichissement de C99 et C83 dans les exosomes sécrétés dans le cerveau de deux modèles de souris Alzheimer (3xTg-AD et AAV-C99).

De façon très intéressante, nous avons également montré, pour la première fois *in vivo*, la présence et l'enrichissement dans ces vésicules d'oligomères d'APP-CTFs dont les niveaux sont très faibles dans les cellules. De plus, ces espèces oligomériques sont enrichies suite à l'inhibition de la γ -sécrétase. Chez l'Homme, peu d'études ont analysé les exosomes sécrétés dans le cerveau des patients Alzheimer. Seulement deux études montrent la présence d'oligomères d'A β ou la présence d'APP-CTFs dans les exosomes de patients Alzheimer ou trisomiques, respectivement (SARDAR SINHA et al., 2018) (PÉREZ-GONZÁLEZ et al., 2019). L'A β associé aux exosomes représenterait en réalité qu'une très petite partie de l'A β total (RAJENDRAN et al., 2006). De plus, il semble peu probable qu'il soit produit directement dans les exosomes car leur environnement neutre ne semble pas adapté à l'activité de la γ -sécrétase. Il serait plus probable que l'A β présent dans la fraction exosomale correspondent en réalité à de l'A β circulant, se fixant sur les exosomes grâce aux glycolipides et glycoprotéines présents à leur membrane (LIM et al., 2019) ou éventuellement *via* sa dimérisation avec le C99 exosomal.

En conclusion, les différentes voies impliquées dans l'élimination du C99 sont altérées chez les patients Alzheimer, ce qui conduit à son accumulation dans les neurones du cerveau et à sa toxicité. Enfin, l'accumulation de C99 peut également être causée par une augmentation de l'activité β -sécrétase, comme c'est le cas chez certains patients Alzheimer, ou un défaut de transport rétrograde, permettant en condition normale de rediriger le C99 des endosomes vers le TGN.

10.2 Toxicité des APP-CTFs dans la MA

Toxicité du C99

La toxicité liée à l'accumulation du C99 a largement été décrite *in vitro* et *in vivo*. Elle a été associée à différentes altérations neuronales comme le dysfonctionnement du système EAL ou de la fonction mitochondriale. Les mécanismes sous-jacents, expliquant le rôle du C99 dans l'apparition de ces défauts, sont de mieux en mieux compris et ont été décrits dans les parties [3.2 La neurotoxicité du C99 et maladie d'Alzheimer](#) ou [4.3 Les dysfonctionnements EAL associés à la maladie d'Alzheimer](#). Ils conduisent, de façon générale, à une altération de la membrane et de l'activité de ces organites. L'accumulation intraneuronale de C99 a également été corrélée avec les déficits synaptiques et cognitifs précoces observés dans les modèles animaux de la MA, contrairement aux plaques séniles qui sont de plus en plus perçues comme inoffensives (LAURITZEN et al., 2016 ; BOURGEOIS et al., 2018) . D'autre part, un lien entre le C99 et la neuroinflammation associée à la MA a également été suggéré dans plusieurs études, nécessitant des recherches plus approfondies (LAURITZEN et al., 2016 ; KAUR et al., 2017). De façon intéressante, les premiers modèles utilisés pour étudier le rôle du C99 et basés sur la surexpression du C99, développent également quasiment tous une neurodégénérescence (OSTER-GRANITE et al., 1996 ; K.-W. LEE et al., 2006), quelque soit la souche ou le promoteur utilisé, en opposition avec les modèles murins FAD dans lesquels il est très rare d'observer cette altération, pourtant caractéristique indéniable chez l'Homme. Cette neurodégénérescence pourrait être par un effet direct du C99, ayant été montré aussi comme augmentant l'accumulation de la protéine Tau (ISRAEL et al., 2012).

Comme présenté précédemment, la toxicité du C99 a été liée principalement au dysfonctionnement du système EAL. De façon importante, ce lien a été confirmé chez l'Homme, notamment dans des neurones dérivés d'iPSC de patients (KWART et al., 2019 ; HUNG et LIVESEY, 2018). Un point crucial, l'ensemble de ces études démontrent que les effets du C99 sont indépendants de l'A β . D'autre part, les travaux du Dr Nixon ont montré que cette accumulation de C99 conduit à une suractivation de la GTPase Rab5 conduisant à un élargissement des endosomes précoces (S. KIM et al., 2016). Xu et collaborateurs propose que cette suractivation de Rab5 conduit aussi à un défaut du trafic rétrograde du NGF — pour "nerve growth factor" — conduisant à la dégénérescence axonale (W. XU et al., 2016). Les études de notre laboratoire ont mis en évidence une accumulation du C99 surtout au niveau

des endosomes tardifs et des lysosomes, induisant un dysfonctionnement de la dégradation lysosomale. Ce dysfonctionnement a été confirmé à la fois dans des modèles de trisomie 21 (Y. JIANG et al., 2010), à la fois dans des neurones iPSCs issus de patients Alzheimer portant des mutations sur l'APP ou sur *PSEN1* (KWART et al., 2019 ; HUNG et LIVESEY, 2018). Les endosomes précoces, les endosomes tardifs ainsi que les lysosomes composent un système interconnecté, expliquant sûrement la toxicité du C99 au niveau de ces différentes organelles intracellulaires. Les altérations des endosomes précoces ont vraisemblablement lieu en premier conduisant par la suite à l'accumulation du C99 dans les autres compartiments de ce système. Enfin, nos travaux présentés dans ce manuscrit montrent la présence du C99 et des oligomères d'APP-CTFs dans les exosomes, des vésicules originaires des endosomes, faisant partie donc partie intégrante du système endosomal (LAURITZEN et al., 2019).

Ces résultats suggèrent que le C99 peut s'accumuler dans l'ensemble des compartiments du système endosomal et avoir une toxicité à chaque niveau. De plus, la présence du C99 dans les exosomes suggèrent une nouvelle toxicité du C99 associée à la propagation de la maladie dans le cerveau. Néanmoins, l'effet bénéfique ou délétère de ces exosomes enrichis en APP-CTFs (sous forme monomérique ou oligomérique) n'a pas encore été élucidé et sera discuté dans la partie [12.1 Exosomes enrichis en C99 : bénéfiques ou délétères?](#). D'autre part, plusieurs études proposent aussi l'accumulation du C99 dans d'autres organelles intracellulaires, tout aussi importantes pour l'homéostasie cellulaire, comme les mitochondries, où le C99 affecterait également leur fonction. Pour finir, une étude suggère que l'accumulation des APP-CTFs induite par des mutations familiales sur *PSEN1* peut entraîner une signalisation aberrante de la cascade CREB ainsi qu'un phénomène de sprouting axonal (DEYTS et al., 2019).

Toxicité des fragments dérivés du C99 ?

Alors que la neurotoxicité du C99 et de son métabolite $A\beta$ est aujourd'hui bien documentée, l'influence des autres fragments dérivés du C99 (C83 ou AICD) dans le développement de la MA reste peu connu. Tout d'abord, l'AICD est augmenté dans les cerveaux de patients Alzheimer et la surexpression chez la souris conduit à des défauts de mémoire (GHOSAL et al., 2009). Cependant, le mécanisme à l'origine de ces défauts étaient jusque là non élucidé, bien que sa fonction en tant que facteur de transcription sur la signalisation cellulaire ait été proposée comme jouant un rôle important (PARDOSSI-PIQUARD et CHECLER, 2012). En effet, l'AICD est connu

comme induisant la transcription de plusieurs gènes impliqués dans la MA, comme la néprilysine (l'enzyme de dégradation de l'A β) ou la GSK3 β (impliquée dans la phosphorylation de Tau). Néanmoins le rôle de ces régulations est incertain. Des travaux récents du Dr Poushina viennent néanmoins apporter des éléments de réponse. En effet, l'augmentation des niveaux d'AICD dans les neurones induit une altération dans le déclenchement de l'activité neuronale hippocampique, ce qui perturbe l'activité synaptique et cognitive chez les souris (POUSINHA et al., 2019; POUSINHA et al., 2017).

En ce qui concerne le fragment C83, les données sont encore plus restreintes. Il est produit par le clivage α -sécrétase soit à partir de l'APPfl, soit à partir du C99 et diffère du C99 uniquement de 16 acides aminés situés en N-terminal du C99. Les « deux » espèces de C83 générées sont distinctes de par leur localisation subcellulaire (membrane plasmique ou endosomes/lysosomes¹, respectivement) et donc potentiellement de par leur toxicité. D'un côté, le C83 pourrait être bénéfique en diminuant les niveaux de C99 et favorisant ainsi indirectement la survie cellulaire (JÄGER et al., 2009; NHAN et al., 2015). D'un autre côté, son accumulation dans les mêmes compartiments que C99 peut suggérer une toxicité similaire. En effet, il est important de noter que le C83 est présent en grande quantité dans les modèles Alzheimer utilisés dans mes travaux ainsi que dans les cerveaux de patients Alzheimer. De façon intéressante, la concentration de ce fragment dans les exosomes excède même celle du fragment C99, suggérant que la majorité du C99 est converti en C83 grâce à un clivage par l' α -sécrétase. Ces observations sont en accord avec la présence des ADAMs (ADAM10 et ADAM17), suggérant un clivage α -sécrétase dans ces vésicules extracellulaires. Comme nous l'avons confirmé dans l'article publié dans *Translational Neurodegeneration*, ce fragment est également retrouvé sous forme monomérique et probablement dimérique/oligomérique en association avec le C99, dans les exosomes (LAURITZEN et al., 2019). La question se pose donc de savoir si ce clivage sert à diminuer la concentration du C99 et donc sa toxicité ou bien si le C83, de par sa similarité de structure avec le C99 et la même localisation, pourrait induire la même toxicité. L'étude du Dr Kwart, utilisant des iPSCs humaines exprimant différents mutants *APP* ou *PSEN1* associés aux FAD, suggère que le phénotype d'endosomes élargis caractéristique de ces mutants ne serait pas dépendant de l'accumulation de C83 (KWART et al., 2019). Pour confirmer

1. il est peut probable que le C83 dérivé du C99 soit produit directement dans les endosomes, car l' α -sécrétase agit en milieu neutre. Nous émettons l'hypothèse que le C99 endosomal soit dirigé dans un premier temps à la membrane plasmique, où il peut être clivé par l' α -sécrétase et le C83 produit s'accumule ensuite dans les endosomes

ces données, il serait donc intéressant d'étudier plus en détail l'impact du clivage α -sécrétase du C99 en C83 en intracellulaire ou intra-exosomal dans le contexte de modèles Alzheimer, le C83 pouvant potentiellement se révéler comme un nouveau fragment toxique dans la MA.

En conclusion, l'accumulation de C99 chez les patients Alzheimer induit une neurotoxicité très précoce et conduit à différents dysfonctionnements caractéristiques de la MA, pour lesquels le lien direct avec le C99 est plus ou moins établi . Cette toxicité pourrait également être médiée par les espèces dérivées du C99 comme le C83 ou les oligomères d'APP-CTFs. Ces évidences définissent le C99 comme un acteur principal dans l'étiologie de la maladie d'Alzheimer.

10.3 Dimérisation du C99 et des APP-CTFs

Évidences de la dimérisation du C99

Nous avons démontré très récemment la présence de dimères et d'oligomères d'APP-CTFs dans les exosomes cérébraux dans deux modèles de souris Alzheimer. Bien qu'il avait été montré auparavant que le C99 était capable de dimériser *in vitro*, comme l'APP, aucune donnée n'avait confirmé cette dimérisation *in vivo* (KIENLEN-CAMPARD et al., 2008 ; BOTEV et al., 2011). La dimérisation du C99 dans les cellules vivantes est moindre en comparaison à celle de l'APP, en raison de l'absence des motifs E1 et E2 stabilisateurs (DECOCK et al., 2015). Les études *in vitro* ont néanmoins permis de mettre en évidence d'autres domaines importants pour la dimérisation du C99, et en particulier les trois motifs GxxxG juxtamembranaires (KIENLEN-CAMPARD et al., 2008). Plus tard, cette équipe a également mis en évidence l'importance du domaine cytosolique, correspondant à l'AICD, pour cette dimérisation (DECOCK et al., 2015). Plus récemment, un autre motif transmembranaire a été montré comme participant à la dimérisation, TVIV (positions 43 à 46), qui est situé dans la région de clivage par la γ -sécrétase. Des mutations sur ces 4 acides aminés sont également retrouvés dans les FAD et diminueraient l'homodimérisation du C99 (Y. YAN et al., 2017). D'autre part, le C99 peut également dimériser avec d'autres protéines ou lipides, ce qui influence son homodimérisation. Tout d'abord, il a été montré que le C99 peut interagir avec le cholestérol grâce aux motifs transmembranaires G25xxxG29. Cette interaction semble d'une part, entraîner le C99 dans les radeaux lipidiques

riches en β - et γ -sécrétases et d'autre part, faire compétition avec la formation des homodimères de C99 (BEEL et al., 2010; Y. SONG et al., 2013; STANGL et SCHNEIDER, 2015). Cette donnée est intéressante sachant que les niveaux de cholestérol sont élevés chez les patients Alzheimer. Le C99 peut aussi se lier à l' $A\beta$ ce qui faciliterait la dimérisation du C99 (SHAKED et al., 2006). Enfin, nous avons montré dans l'article 2, grâce à des approches génétique, pharmacologique et immunologiques que le C99 pouvait probablement s'hétérodimériser avec le C83, ces homo- et hétérodimères d'APP-CTFs étant enrichis dans les exosomes sécrétés par des modèles de la MA. Les mécanismes sous-tendant cet enrichissement spécifiquement au niveau des exosomes ont été décrits dans l'article 2 et seront discutés dans la partie [12.1 Exosomes enrichis en C99 : bénéfiques ou délétères ?](#). À noter toutefois que l'inhibition pharmacologique ou génétique de la γ -sécrétase conduit à une forte augmentation de ces oligomères dans les cellules et dans les exosomes.

Rôle de ces dimères/oligomères ?

L'intérêt physiologique ou pathologique de la dimérisation du C99 reste encore débattue. Plusieurs travaux ont étudié l'effet de mutations au niveau des motifs transmembranaires GxxxG sur la capacité du C99 à dimériser et le lien avec l'activité γ -sécrétase et la génération $A\beta$, et ont abouti à des résultats contradictoires. Tout d'abord, le Dr Munter a montré que la mutation des glycines en alanine sur ce motif entraînent une réduction de la dimérisation du C99 et une baisse de l' $A\beta_{42}$. D'après ces résultats, les auteurs ont proposé qu'un encombrement stérique, induit par la formation des dimères, perturbe le clivage du C99 par la γ -sécrétase conduisant à la génération d'espèces plus longues d' $A\beta$ ($A\beta_{42}$) (MUNTER et al., 2007). Au contraire, le Dr Kielen-Campard a démontré que la mutation des glycines en leucine sur ces mêmes motifs GxxxG provoque un changement de conformation du C99, favorisant sa dimérisation. L'augmentation de la dimérisation s'accompagne d'une diminution de la production d' $A\beta_{40}$ et d' $A\beta_{42}$, suggérant que les formes dimériques ne sont pas des substrats optimaux pour la γ -sécrétase (KIENLEN-CAMPARD et al., 2008). Plusieurs études ont ensuite confirmé ce dernier résultat, montrant une diminution du clivage γ -sécrétase suite à la dimérisation du C99 (EGGERT et al., 2009; WINKLER et al., 2015; DECOCK et al., 2015). Enfin, d'autres études soutiennent l'idée l'utilisation des mutants sur les leucines ou alanines de C99 modifie l'activité γ -sécrétase, induisant une forte production d' $A\beta$, indépendamment d'une modification de la dimérisation du C99 (DECOCK et al., 2016; HIGASHIDE

et al., 2017). En accord avec cette idée, l'étude du Dr Decock montre que la mutation flamande de l'APP (A617G), qui ajoute un quatrième motif GxxxG proche du domaine transmembranaire, provoque une agrégation de l'A β sans effet majeur sur la dimérisation du C99 (DECOCK et al., 2015).

Dans nos travaux, nous avons observé que les mutants C99 G33L ou G29L/G33L augmentent l'oligomérisation du C99, formant des hétéro- et homo-oligomères, notamment avec le C83 (LAURITZEN et al., 2019). C'est en accord avec les premiers travaux du Dr Kielen-Campard ayant utilisé les mêmes mutants. De façon intéressante, nous avons également constaté que l'inhibition de la γ -sécrétase dans les cellules surexprimant le C99 sauvage permet de mimer le profil de dimérisation obtenu avec les mutants de C99, suggérant dans notre cas un lien entre la γ -sécrétase et la formation d'oligomères. Cette dernière observation permet aussi d'exclure que ces oligomères puissent être des oligomères d'A β . Enfin, des études immunocytochimiques ont permis de démontrer que ces oligomères sont préférentiellement localisés dans les endosomes et lysosomes. Nos résultats mettent donc en avant l'importance de l'environnement subcellulaire (pH, lipides...) dans la dimérisation du C99, ce qui peut expliquer les différences obtenues dans la littérature sur ce sujet. Inversement, la dimérisation/oligomérisation du C99 modifie son insertion dans la membrane, son clivage par la γ -sécrétase ou son interaction avec d'autres protéines, pouvant induire possiblement des phénotypes délétères. La question importante à présent est donc de déterminer si les oligomères de C99 sont plus ou moins toxiques que les monomères.

Paramètres influençant la dimérisation/oligomérisation

Les résultats obtenus pendant ma thèse montrent donc que, dans nos systèmes cellulaires (SH-SY5Y et MEF), la dimérisation des APP-CTFs semble dépendre : (1) de la conformation du C99 à la membrane, (2) du niveau d'activité de la γ -sécrétase et (3) de la localisation intracellulaire du C99, qui impose un environnement particulier (pH, composition en lipides etc.). En effet, plusieurs études proposent que les membranes épaisses et la présence de radeaux lipidiques favorisent la dimérisation des APP-CTFs et également l'activité γ -sécrétase (O. HOLMES et al., 2012; PANTELOPULOS et al., 2018; AUDAGNOTTO et al., 2016; O. HOLMES et al., 2012; WINKLER et al., 2015). Comme indiqué précédemment le motif G25XXXG29 est important pour l'interaction du C99 avec le cholestérol. Il est donc possible que le mutant G29L/G33L n'interagisse plus ou faiblement avec le cholestérol, facilitant sa homomérisation. D'autre part, les mutations sur les motifs GxxxG

peuvent également altérer son transport intracellulaire ; cet aspect sera discuté dans la partie [7.1 La biogenèse des exosomes](#). A ce jour, nous n'avons pas établi le rôle exact de ces mutants et l'effet bénéfique ou délétère de l'oligomérisation des APP-CTFS, notamment dans le contexte de la MA.

En conclusion, la dimérisation du C99 pourrait jouer un rôle important dans sa toxicité et pourrait donc être ciblée pour réduire sa pathogénicité. Des études supplémentaires sont nécessaires pour élucider cette hypothèse.

Réduction du C99 : une stratégie thérapeutique ?

Au vu de la toxicité du C99, nous nous sommes posés la question de savoir si empêcher l'accumulation ou réduire spécifiquement les taux de C99 pourrait permettre de ralentir ou guérir la maladie d'Alzheimer. Alors que la majorité des essais cliniques cherchent à réduire ou bloquer l'A β , nous pensons que cibler cet acteur plus précoce peut se révéler être une meilleure stratégie. Avant de décrire les deux pistes thérapeutiques pouvant agir directement sur le C99, je commencerai néanmoins par une mise en garde contre une stratégie également envisagée : l'utilisation des inhibiteurs γ -sécrétase.

11.1 Mise en garde contre les inhibiteurs de la γ -sécrétase

En accord avec le postulat de la cascade amyloïde, les premières stratégies thérapeutiques ont visé à réduire les niveaux d'A β dans le cerveau des malades. Dans cette optique, la réduction de l'activité de la γ -sécrétase peut être une piste envisageable. Certaines études pré-cliniques ont d'ailleurs validé cette stratégie *in vitro* et *in vivo* conduisant au développement d'inhibiteurs pharmacologiques de la γ -sécrétase (GSI). En effet, l'invalidation partielle de PS1 ainsi que certains de ces inhibiteurs permettent une amélioration de la plasticité synaptique et des défauts cognitifs chez la souris (BEST et al., 2007 ; TOWNSEND et al., 2010 ; COMERY et al., 2005). Cependant chez l'Homme, tous les essais cliniques basés sur l'utilisation d'inhibiteurs de la γ -sécrétase ont été arrêtés car ces drogues n'ont montré aucun effet sur les fonctions cognitives voire une aggravation du déclin cognitif, malgré une diminution des niveaux d'A β (CORIC et al., 2012 ; DOODY et al., 2015). Ces

résultats ne sont que peu surprenants au vu des effets délétères majeurs que provoque une invalidation de PS1 chez la souris (DONOVIEL et al., 1999 ; HERREMAN et al., 1999) (voir [Table 13.9](#)). Ces effets délétères pourraient donc être attribués à l'accumulation de C99, comme le suggèrent nos travaux et ceux de d'autres équipes (PIMPLIKAR et al., 2010 ; LAURITZEN et al., 2016 ; HAMM et al., 2017). En effet, dans nos modèles murins de la MA, l'utilisation d'inhibiteur de la γ -sécrétase amplifie la charge intracellulaire en C99, exacerbant notamment la pathologie lysosomale autophagique, mais également la charge extracellulaire, comme démontré très récemment avec l'enrichissement des exosomes en APP-CTFs monomériques et oligomériques dans les exosomes. L'accumulation de C99 a également été associée à une altération des réseaux neuronaux entraînant des déficits synaptiques et cognitifs, pouvant expliquer l'effet négatif de ces drogues. D'autre part, ces inhibiteurs ont provoqué lors des essais cliniques des effets secondaires importants comme une toxicité au niveau gastrointestinal et un risque augmenté de cancer cutané. Ces effets sont liés notamment à l'impact de ces drogues sur la voie Notch, qui est aussi un substrat de la γ -sécrétase. En effet, les limites de cette stratégie reposent également sur le grand nombre de substrats de la γ -sécrétase. Une stratégie alternative est en développement et vise à augmenter l'activité carboxypeptidase grâce à des modulateurs de la γ -sécrétase ([GSM](#)). En effet, ces drogues favorisent la formation de formes plus courtes d'A β (A β 38 et A β 37) et de façon très importante, ne semblent pas avoir d'effet sur l'accumulation de C99 ou le clivage Notch (BURSAVICH et al., 2016 ; TRAMBAUER et al., 2017). De façon intéressante par rapport à nos travaux, ces drogues ont été proposées comme agissant sur la dimérisation du C99 puisque leur site de liaison chevauche les motifs GxxxG (RICHTER et al., 2010). Cette stratégie a déjà été montrée comme améliorant les fonctions cognitives chez un modèle de souris Alzheimer (Tg2576). Cette étude avait également pour but de comparer les effets des GSI *versus* les GSM. Alors que les GSI ont montré un effet bénéfique à court terme, ils entraînent une altération de la fonction cognitive à long terme, accompagnée d'une accumulation progressive des APP-CTFs. Au contraire, ces effets délétère à long terme ne sont pas observés avec les GSM (MITANI et al., 2012). Cette piste thérapeutique semble néanmoins, à première vue, principalement adaptée pour les FAD associées à des mutations sur *PSEN1* ou *PSEN2* ou à des mutations sur l'*APP* proche des sites de clivage de la γ -sécrétase et entraînant une production de formes longues d'A β . Enfin, la difficulté reste à présent de trouver un GSM capable de traverser la barrière hémato-encéphalique, car les molécules découvertes jusqu'ici sont de très grande taille et très lipophiles. Une autre limite

liée à l'utilisation de ces GSM est le manque de connaissance quant au mécanisme exact de leur action. Enfin, une question reste toutefois en suspens : les formes plus courtes d'A β sont-elles réellement moins toxiques ?

Pour résumé, cette approche s'appuie sur l'idée que l'espèce toxique dans la MA est l'A β et non le C99. Cependant les échecs relatifs à l'utilisation d'inhibiteur γ -sécrétase soulèvent de réelles interrogations à ce sujet et suggèrent peut être de se tourner vers d'autres stratégies thérapeutiques visant à agir en amont de ce peptide, à savoir en ciblant le C99. Dans cette optique, je discuterai de deux pistes potentielles qui me semblent plus adaptées : les inhibiteurs de la β -sécrétase ou l'activation de la dégradation lysosomal-autophagique.

11.2 Inhibiteurs de la β -sécrétase

Le fragment C99 est produit après clivage de l'APP par la β -sécrétase, dont l'activité est portée par la protéase BACE1. Ce clivage constitue l'étape limitante dans la production de l'A β . L'activité de BACE1 est augmentée dans les cerveaux de patients Alzheimer atteints de formes sporadiques. De plus, certaines mutations FAD sur l'APP ayant lieu autour de la séquence de reconnaissance de la β -sécrétase (comme la mutation suédoise) entraîne également une augmentation du clivage β -sécrétase. Au contraire, la mutation protectrice contre la MA, la mutation islandaise située proche du site β -sécrétase, permet de diminuer le clivage par BACE1. Plus précisément, d'après les travaux du Dr Kwart et al. dans des iPSCs humains, cette mutation augmenterait la production du C89 (non-amyloïdogénique) et réduirait celle du C99, sans affecter les niveaux totaux de β -CTFs (KWART et al., 2019). En ce sens, une approche thérapeutique basée sur l'utilisation d'inhibiteurs de la β -sécrétase a été proposée. Cette stratégie avait pour but initial de réduire les niveaux d'A β mais son intérêt semble aujourd'hui plus important vis-à-vis de l'accumulation du C99. Des nombreuses études pré-cliniques ont montré des effets bénéfiques de cette stratégie notamment sur la pathologie endosomale-lysosomale-autophagique associée au C99 mais également sur les déficits synaptiques et cognitifs (HUNG et LIVESEY, 2018 ; FARZAN et al., 2000 ; LAIRD et al., 2005 ; TAMAYEV et al., 2012 ; COLACURCIO et al., 2018 ; Y. JIANG et al., 2016 ; HAMM et al., 2017 ; MONDRAGÓN-RODRÍGUEZ et al., 2018) (voir [Table 13.8](#)). Chez les patients Alzheimer, les inhibiteurs β -sécrétase

testés en essais cliniques diminuent bien les niveaux d'A β mais malheureusement aucune amélioration cognitive n'est observée voire même une aggravation du déclin cognitif chez certains patients (PANZA et al., 2018). Pour ces raisons, plusieurs inhibiteurs β -sécrétase ont donc été retirés des essais cliniques, le dernier en date est l'Elenbecestat en septembre dernier.

Plusieurs arguments peuvent expliquer ces résultats décevants. Tout d'abord, la β -sécrétase a de nombreux substrats dont la neuroréguline 1 (NRG1) qui a un rôle important dans la myélinisation des axones ou la protéine SEZ6 impliquée dans la connectivité neuronale (DE STROOPER et al., 2010; R. YAN et VASSAR, 2014). Il est donc possibles que les effets délétères soient liés à une inhibition de processus essentiels pour d'autres fonctions physiologiques. En accord avec cette idée, il a été montré par ailleurs que les inhibiteurs de BACE1 conduisent à une hypomyélinisation associées à des crises épileptiques chez la souris. La difficulté également avec cette approche est liée à son large site d'action, en ce sens les inhibiteurs de BACE1 peuvent probablement inhiber son homologue BACE2, présentant aussi des rôles physiologiques, ou la cathepsine D, autre aspartyl protéase, qui est importante pour la dégradation lysosomale. Face à ce problème, pourrait-on envisager, comme pour la γ -sécrétase, des modulateurs de BACE1, ciblant uniquement l'APP? D'autre part, une étude récente a également montré que le traitement avec un inhibiteur β -sécrétase chez la souris entraîne l'accumulation massive du fragment A η - α , qui s'avère toxique et potentiellement responsables des effets secondaires (WILLEM et al., 2015). Ces observations restent à vérifier dans des études futures. Un autre argument fort mis en avant par les spécialistes du domaine, est une intervention trop tardive. En effet, l'accumulation de C99 est déjà trop importante, expliquant peut être le manque d'effet et les effets secondaires. Cependant, même les essais cliniques réalisés chez des patients pré-symptomatiques à risque pour la MA ont été arrêtés en raison de l'augmentation du déclin cognitif par rapport au groupe placebo. De plus, cette stratégie semble adaptée pour les cas familiaux où l'accumulation de C99 est induite par des mutations sur l'APP ou les présénilines ou par une augmentation de la γ -sécrétase dans certains cas sporadiques. Mais dans tous les autres, l'origine de l'accumulation du C99 semble plus complexe et les phénotypes associés peuvent être induits par d'autres facteurs encore mal connus et en amont (APOE 4? cholestérol?) (LIN et al., 2018; NURIEL et al., 2017).

En conclusion, ces résultats révèlent deux points importants quant à la stratégie utilisant les inhibiteurs β -sécrétase : la nécessité de trouver de nouveaux biomarqueurs encore plus précoce pour permettre une intervention le plus tôt possible, la nécessité d'améliorer la spécificité de cette stratégie et/ou la nécessité de pistes thérapeutiques complémentaires, comme par exemple cibler la dégradation des protéines toxiques.

11.3 Activation de la dégradation lysosomale et autophagique

Une stratégie prometteuse

Comme largement présenté auparavant, la dégradation lysosomale-autophagique est déficiente chez les patients Alzheimer, de façon très précoce et quasi-systématique. Un grand nombre de travaux ont donc cherché à induire l'autophagie en vue d'une application thérapeutique pour la MA. Cependant, cette stratégie peut être limitée, en raison du fait que les lysosomes, étape finale dans la dégradation autophagique, sont également déficients chez les patients Alzheimer. C'est pourquoi nous proposons, ainsi que d'autres équipes dans le cas de d'autres maladies neurodégénératives, de cibler directement le facteur de transcription EB (TFEB) qui a l'avantage d'activer à la fois la biogenèse lysosomale et le processus autophagique. Plusieurs arguments sont en faveur de cette piste thérapeutique :

- (1) le TFEB agit sur de nombreux acteurs et mécanismes associés à la dégradation lysosomale-autophagique, notamment la formation, l'acidification, l'activité des hydrolases au niveau des lysosomes ainsi que l'initiation, l'élongation du phagophore, la fusion des vésicules dans le processus autophagique (SARDIELLO, 2016)
- (2) plusieurs études suggèrent que le dysfonctionnement lysosomal-autophagique est associé à une fonction défectrice du TFEB dans la MA, même si cette donnée reste controversée)
- (3) plusieurs études ont montré un effet bénéfique des approches visant à activer le TFEB, que ce soit dans le cas de la MA ou de d'autres maladies neurodégénératives. Plus précisément, cette stratégie permet la diminution des protéines agrégées caractéristiques de ces maladies, notamment la protéine Tau et l'A β , ainsi qu'une amélioration du comportement chez des modèles murins. L'effet du TFEB sur la

clairance des protéines agrégées a également été démontré dans les neurones, les astrocytes et les microglies (NAPOLITANO et BALLABIO, 2016). Toutefois, ces études s'intéressent aux marqueurs tardifs de la MA.

(4) l'autophagie permet de cibler spécifiquement les protéines agrégées et/ou toxiques. En effet, l'équipe du Dr Polito a montré que la surexpression du TFEB dans un modèle Tau permet de réduire uniquement les protéines Tau hyperphosphorylées et agrégées, sans altérer les niveaux de Tau endogène (POLITO et al., 2014).

(5) la surexpression du TFEB chez des souris sauvages n'induit pas de phénotype délétère (pas d'altérations de la masse corporelle, du poids du cerveau, pas d'anomalie des structures cérébrales, de la structure des neurones, pas de problème d'apprentissage et de mémorisation) (POLITO et al., 2014; H. WANG et al., 2016b).

Dans nos travaux récents présentés dans l'article 1 (6.2 Objectifs 1 et 2 – Article 1), nous validons cette stratégie sur un marqueur très précoce de la MA, le C99. En effet, nous avons surexprimé le TFEB chez des souris Alzheimer (3xTg-AD) grâce à une approche virale, avant (ICV) ou après le début de l'accumulation du C99 (stéréotaxie). Dans les deux cas, nous avons montré que la surexpression du TFEB induit une diminution des niveaux de C99 dans le cerveau. Il serait également intéressant de voir l'effet du TFEB sur les formes oligomériques *in vivo*. En effet, nos résultats préliminaires suggèrent que le TFEB participe également à la clairance des oligomères d'APP-CTFs. Ces résultats proposent donc une nouvelle piste thérapeutique pour réduire la toxicité du C99. Pour des raisons purement techniques, nous n'avons pas pu analyser si cette réduction du C99 pouvait être associée à une amélioration des autres phénotypes de la MA. Donc, bien évidemment, les effets du TFEB devront être vérifiés sur les phénotypes associés au C99, à commencer par la pathologie EAL mais également sur les déficits synaptiques (LTP) et cognitifs (apathie, apprentissage, mémorisation), l'inflammation et potentiellement la propagation de la maladie dans le cerveau. En effet, la surexpression du TFEB a déjà été montrée comme étant bénéfique dans le contexte de la propagation. Enfin, notre modèle de souris 3xTg-AD nous permettra également d'évaluer son effet sur la pathologie amyloïde et la pathologie Tau. Notre approche utilisant des virus exprimant le TFEB présente cependant des limites. La plus grande critique possible est liée à la surexpression d'une protéine exogène, qui va être sous le contrôle artificiel d'un promoteur endogène. L'approche en ICV peut également être critiquée, en raison des biais que peuvent entraîner une surexpression, dès la naissance et no-

tamment sur le développement, mais également dans plusieurs régions cérébrales, dont les régulations peuvent interférer avec nos interprétations en comportement notamment. À l'avenir et en particulier pour les études de comportement, nous envisageons donc une approche stéréotaxique permettant de limiter l'expression à l'hippocampe. Néanmoins bien que cette stratégie de surexpression du TFEB semble très prometteuse, elle est difficilement applicable telle quelle chez le patient. C'est pourquoi, la recherche de drogues permettant l'activation du TFEB endogène suscite donc un intérêt croissant dans le domaine de la MA. Il faut quand même noter que la thérapie génique est en train de connaître un essor dans le contexte de la MA, ces dernières années.

Approche pharmacologique : envisageable ?

Plusieurs drogues, ayant un effet notoire sur l'activation de l'autophagie et ayant été validées dans d'autres pathologies, sont actuellement testées en essai clinique sur des patients Alzheimer ou MCI (resveratrol, metformine, curcumine). D'autres drogues, prescrites ou testées en essais cliniques dans le cadre de pathologies différentes, ont aussi été montrées comme activant le TFEB : c'est le cas de l'HP β CD (maladie de Niemann-Pick C), le trehalose (ataxie spinocérébelleuse), le tideglusibe (paralysie progressive supranucléaire) ou le temsirolimus (carcinome/lymphome), drogues que j'ai testés au cours de mes travaux. Ces drogues agissent de façon directe ou indirecte sur la phosphorylation du TFEB, permettant sa translocation dans le noyau et son activation. De plus, elles ont toutes été montrées dans la littérature comme favorisant la clairance de protéines agrégées notamment dans des modèles Alzheimer et pour certaines ayant un effet bénéfique sur les fonctions cognitives (YAO et al., 2012; T. JIANG et al., 2014; H. WANG et al., 2016a; PALMIERI et al., 2017). Malheureusement, dans notre modèle cellulaire (SH-APP_{swe}) ces 4 drogues n'ont pas permis de réduire les niveaux de C99, voire ont entraîné un effet aggravateur. Ces résultats négatifs montrent donc la difficulté de cette approche pharmacologique. Cette difficulté repose principalement sur la spécificité de ces drogues, dont les mécanismes moléculaires ne sont entièrement caractérisés et peuvent donc entraîner des effets secondaires. Par exemple, le HP β CD a été démontré comme ayant des effets bénéfiques à court terme, en activant le système lysosomal-autophagique. Mais il devient délétère lors de son administration sur une plus longue période, car il a un effet sur les lipides membranaires, empêchant la formation des autolyosomes et donc conduisant à un défaut de la dégradation des substrats autophagiques (D.-S. YANG et al., 2017). De plus, les drogues jouant

directement sur les kinases régulant la phosphorylation du TFEB comme la Ti-deglusibe (inhibiteur de la GSK3 β) peuvent entraîner des effets secondaires liés à la régulation conjointe des autres substrats de ces kinases (par exemple Tau). Ces résultats mettent donc en garde contre l'utilisation de ces drogues actuellement chez les patients. Cette stratégie visant le TFEB présente donc également des points faibles mais semblent cependant plus appropriée qu'une approche visant directement la voie mTOR ou la voie AMPK, qui sont des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires indépendants de l'autophagie. Malgré de nombreuses études suggérant que l'activation du système lysosomal-autophagie peut être bénéfique dans le contexte de la MA, plusieurs questions importantes sont à prendre en considération avec cette nouvelle piste thérapeutique : quand agir ? quel serait l'effet d'une activation prolongée de l'autophagie ? faut-il privilégier une drogue donnée en fonction du phénotype "lysosomal/autophagique" du patient (médecine spécialisée) ?

Limites de cette stratégie

Nous savons qu'en l'état actuel le diagnostic chez les malades Alzheimer se fait assez tardivement. Il est donc important de se demander si l'approche thérapeutique visant le TFEB reste applicable dans ces conditions. La réponse n'est à ce jour pas clairement établie. Des études montrent néanmoins que le traitement à la rapamycine, qui est un activateur de l'autophagie via l'inhibition de mTOR, n'a pas d'effet sur des modèles sévères de la maladie d'Alzheimer (5xFAD) ou de tauopathie (rTG4510), ni dans le cas d'une intervention trop tardive. Toutefois, nous avons démontré dans l'article 2 que la surexpression du TFEB peut induire une réduction des niveaux de C99 que ce soit avant ou après le début de l'accumulation du C99, pouvant suggérer un effet du TFEB en préventif ou en curatif. Il est néanmoins nécessaire de préciser que dans notre modèle d'étude, l'accumulation du C99 à 4 mois reste encore modérée, augmentant avec l'âge. L'avantage d'une telle stratégie serait d'une part de favoriser l'élimination du C99, mais également des autres protéines neurotoxiques s'accumulant avec l'âge dans la MA, comme l'A β et la protéine Tau. Enfin, l'avantage majeur de cette stratégie par rapport à une celle liée à l'inhibition de la β -sécrétase est la réduction/élimination du C99 quelque soit la raison de son accumulation.

La deuxième question interroge sur les effets néfastes que pourraient induire une activation prolongée de l'autophagie. Pour reprendre l'exemple de la rapamycine,

son administration sur une longue durée suite à une greffe ne semble pas entraîner d'effets secondaires trop importants. Cependant, une activation prolongée de l'autophagie a aussi été montrée comme étant néfaste, pouvant entraîner la mort neuronale suite à une dégradation trop importante des composants cytosoliques (RUBINSZTEIN et al., 2015) ou compromettre la durée de vie (ZHOU et al., 2019). D'autre part, outre son rôle dans la dégradation cellulaire, des rôles « émergents » sont attribués à l'autophagie notamment dans la réparation de l'ADN, l'inflammation ou la sécrétion de protéines (PENG et al., 2019 ; BOLAND et al., 2018). Ces mécanismes pouvant potentiellement être altérés lors d'une activation prolongée de ce système, conduisant à des effets néfastes.

Enfin, un point important à mettre en considération lors de la recherche d'une stratégie pharmacologique en pré-clinique, quelque soit la pathologie, est le modèle à utiliser. De toute évidence, dans le cas de la MA, les modèles majoritairement utilisés sont largement criticables, comme évoqué précédemment avec les modèles de surexpression, mais surtout ne représentent que 1% de tous les cas. Pour une meilleure caractérisation des drogues, l'utilisation de fibroblastes ou d'iPSC de patients me semble une nécessité.

En conclusion, la stratégie visant à réduire l'accumulation de C99 via l'activation du TFEB semble prometteuse. Néanmoins, il est possible que l'approche pharmacologique se heurte à des problèmes de spécificité. Enfin, à nouveau, une intervention le plus tôt possible peut se révéler primordiale pour que cette stratégie thérapeutique soit efficace et probablement encore plus si elle est combinée avec des changements d'hygiène de vie, la restriction alimentaire ou l'activité physique permettant aussi d'activer le TFEB (BOLAND et al., 2018).

Le C99 : un rôle dans la propagation de la MA ?

Dans l'article 2 publié dans le journal *Translational Neurodegeneration*, nous avons démontré que les exosomes sécrétés par des modèles cellulaires ou murins de la MA sont enrichis en C99 et C83 monomériques mais également en APP-CTFs oligomériques. Sachant que cette pathologie se caractérise par une propagation progressive des lésions, nous nous demandons donc si ces exosomes ne pourraient pas être un moyen de véhiculer la pathologie associée au C99 dans le cerveau. Une autre alternative serait que cette sécrétion constitue de façon bénéfique un moyen pour les neurones d'éliminer le C99 toxique, pour qu'il soit ensuite dégradé par les cellules gliales ou dilué dans le cerveau en se déversant dans les liquides interstitiels. Cette fonction serait alors que transitoire, pouvant suggérer un rôle bénéfique puis délétère des exosomes en fonction du stade de la maladie, comme c'est le cas pour la neuroinflammation.

12.1 Exosomes enrichis en C99 : bénéfiques ou délétères ?

Alors que les APP-CTFs monomériques avaient déjà été identifiés dans les exosomes issus de cerveaux de souris Alzheimer, la nouveauté de ces travaux repose sur l'observation de formes oligomériques d'APP-CTFs *in vivo* dans les exosomes et du rôle de la γ -sécrétase dans cet enrichissement. Nous avons montré que cette oligomérisation se fait au niveau des endosomes, et notamment lorsque la γ -sécrétase est inhibée. Nos résultats suggèrent également que le trafic de ces oligomères est altéré, dû notamment à un défaut du transport rétrograde médié par SORLA. Les oligomères se retrouvent donc sélectivement dans les compartiments endolysosomiaux, y compris les exosomes. Il est possible que dans un contexte plus général,

chez les patients Alzheimer l'accumulation du C99 dans les endosomes pourrait être associée à un défaut de transport rétrograde médié par SORLA, soit à cause d'une oligomérisation du C99, soit à cause d'une altération de SORLA, soit les deux. Des variants de SORLA ont d'ailleurs été identifiés comme étant des facteurs de risque de la MA. Il serait donc intéressant de voir l'effet de ces variants sur l'accumulation du C99.

Rôles de ces exosomes ? Au delà du mécanisme exact conduisant à la sécrétion de ces exosomes enrichis en APP-CTFs mono- et oligomériques, une question importante est de déterminer leur rôle dans la MA : bénéfiques ou délétères ? D'un côté, ces exosomes pourraient être une voie alternative pour palier au dysfonctionnement EAL. En effet, ces vésicules pourraient être un moyen d'éliminer le C99 toxique et permettre sa dégradation notamment par les microglies. Nous avons montré dans ce travail la présence d'APP-CTFs dans les microglies, alors que dans nos modèles le C99 surexprimé est sous le contrôle d'un promoteur neuronal. Ces observations suggèrent que les APP-CTFs contenus dans les exosomes peuvent *a priori* être capturés par les microglies. Des études complémentaires sont donc nécessaires pour comprendre les conséquences de cette capture microgliale des exosomes. Induit-elle une inflammation ? Participe-t-elle à la propagation de la pathologie associée au C99 ? La propagation se fait-elle également de neurones en neurones ? Cette propagation reflèterait alors un rôle plutôt délétère des exosomes.

En ce qui concerne l'inflammation, une étude récente du laboratoire démontre une inflammation chez les souris AAV-C99, qui est amplifiée lors du traitement avec le D6. Ces résultats pourraient suggérer que l'inflammation observée dans ce modèle est médiée par le C99 et notamment par les oligomères d'APP-CTFs. Pour répondre à cette question, nous pourrions envisager de purifier des exosomes enrichis ou non en C99 monomérique ou oligomérique et de les ajouter dans le milieu de cultures primaires de microglies. L'étude des cytokines pro- ou anti-inflammatoires ainsi que la morphologie mitochondriale pourraient nous renseigner sur l'état d'activation des microglies et nous permettre d'établir un lien entre les différentes formes de C99 et la neuroinflammation. Une comparaison des cytokines sécrétées par les souris AAV-C99 traitées ou non avec le D6 permettrait de valider ces résultats *in vivo*.

D'autre part, pour étudier la propagation plusieurs expériences sont envisageables. Une première analyse sur des neurones en culture pourrait nous permettre de vérifier si le transfert d'exosomes enrichis en APP-CTFs permet d'induire la pathologie

EAL ou une cytotoxicité chez des neurones naïfs. Cette stratégie a notamment été utilisée par le Dr Sinha à partir d'exosomes purifiés à partir de cerveaux humains et riches en oligomères d'A β et entraînant une cytotoxicité dans la cellule receveuse (SINHA et al., 1999). *In vivo*, une des stratégies que nous pourrions entreprendre pour déterminer le caractère bénéfique ou délétère de ces exosomes, nous pourrions envisager de traiter les souris AAV-C99 avec le GW4869, qui permet d'inhiber la nSMase et donc la production et sécrétion d'exosomes. Dans nos travaux, l'utilisation de cet inhibiteur entraîne une forte augmentation des formes oligomériques des APP-CTFs *in vitro*. D'autre part, cette stratégie a entraîné une diminution de l'A β_{42} et du nombre de plaques dans le modèle 5xFAD, suggérant ainsi un rôle des exosomes dans la formation des plaques séniles (DINKINS et al., 2014). Pour déterminer le rôle éventuel des microglies dans cette propagation, nous pourrions utiliser la stratégie employée par le Dr Asai pour étudier la propagation de la pathologie Tau, en réalisant une déplétion des microglies. Dans un deuxième temps, nous pourrions envisager de suivre les exosomes *in vivo* et d'étudier de cette manière la potentielle propagation des APP-CTFs dans le cerveau de modèles Alzheimer. Le suivi des exosomes *in vivo* reste encore un véritable challenge. L'équipe du Dr van Niel propose une technique innovante pour le suivi des exosomes *in vivo*, tirant avantage du modèle trans lucide du zébra fish et du rapporteur CD63-pHuroïne utilisé pour visualiser les exosomes en microscopie fluorescente (VERWEIJ et al., 2019). Cette technique pourrait être envisagée dans des modèles zébra-fish de la MA, nouvellement développés (SALEEM et KANNAN, 2018). Pour faire le lien avec la partie précédente, ces modèles présentent également l'avantage de pouvoir tester des drogues thérapeutiques facilement.

En conclusion, ce projet, tout nouveau dans le laboratoire, ouvre la porte à un grand nombre de questionnements et de perspectives. L'objectif des futurs travaux sera donc d'étudier la toxicité de ces exosomes enrichis en APP-CTFs et déterminer leur rôle dans la propagation de la maladie d'Alzheimer. La présence du C99 dans les exosomes dans des modèles de la MA propose aussi son potentiel possible comme biomarqueur. Comme de nombreuses études montrent aussi un lien étroit entre la sécrétion exosomale et la fonction lysosomale-autophagique, il est possible que ce dysfonctionnement précoce dans la MA induisent la sécrétion des exosomes enrichis en C99. Ces aspects seront discutés par la suite et proposent alors les exosomes enrichis en C99 ou APP-CTFs plus généralement comme nouveaux biomarqueurs de la MA.

12.2 C99 : biomarqueur de la MA ?

Comme évoqué précédemment, le vrai challenge dans la maladie d'Alzheimer est aujourd'hui de trouver un biomarqueur précoce, ce qui permettrait de traiter les malades le plus tôt possible et nous l'espérons de ralentir ou éviter le développement de la maladie.

Le diagnostic actuel de la MA repose majoritairement sur des tests neuropsychologiques et sur une analyse *in situ* des plaques amyloïdes par imagerie cérébrale (PET). Trois biomarqueurs peuvent également être évalués dans le liquide céphalo-radien (LCR) des patients pour confirmer le diagnostic : l'A β 42 (diminution), la protéine Tau totale ou la protéine Tau phosphorylée (P-Tau Thr181) (augmentation). En effet, le LCR étant en contact direct avec le parenchyme cérébral, il peut refléter les changements biochimiques ayant lieu dans le cerveau. Cependant, ces biomarqueurs sont souvent retrouvés chez les patients « sains » âgés ou associés à d'autres pathologies. L'équipe du Dr Dubois a donc développé un nouveau système appelé « A/T/N » pour Amyloïde, Tau et Neurodégénérescence qui permet une meilleure spécificité du diagnostic. Toujours dans le but d'améliorer le diagnostic, le Dr Lim a également montré très récemment que l'A β lié aux exosomes semble être un meilleur marqueur que l'A β circulant (LIM et al., 2019). Néanmoins, ces biomarqueurs restent des marqueurs tardifs de la maladie. Nous le savons aujourd'hui, une intervention à un stade avancé compromet l'efficacité des traitements thérapeutiques et donc le devenir du patient. Beaucoup de laboratoires cherchent donc à déterminer des marqueurs plus précoces de la maladie.

De façon intéressante, la présence du C99 dans les exosomes ouvre de nouvelles portes en terme de diagnostic. En effet, les exosomes sont sécrétés par les cellules cérébrales et circulent dans les fluides biologiques, dont le LCR. De plus, l'accumulation du C99 est considérée comme un marqueur précoce de la MA, tout du moins chez la souris. Les cerveaux de patients Alzheimer présentent également une accumulation de C99, mais ces analyses ayant été réalisées à des stades avancés, elles ne renseignent pas sur les niveaux de C99 à des stades plus précoces. Dans nos travaux récents, nous avons montré que le C99 et ses dérivés sont enrichis dans les exosomes purifiés à partir de cerveaux de modèles murins de la MA. Cette présence de C99 est spécifique des exosomes purifiés à partir des modèles de la MA puisqu'il est indétectable dans les exosomes issus de conditions contrôles. Le C99 pourrait donc être envisagé comme un biomarqueur spécifique à la MA, présent

dans le LCR. Des études préliminaires réalisées par le Dr Lauritzen, en collaboration avec le Dr Petit-Patel, ont confirmé la présence de C99 dans le LCR de souris. De plus, la comparaison des LCR issus de souris AAV-C99 ou AAV-FREE a montré une augmentation des niveaux de C99 dans la condition pathologique. Ces résultats très positifs nous encouragent à explorer le potentiel du C99 en tant que biomarqueur précoce de la MA, et donc à analyser la présence de ce C99 dans le LCR de patients. Restera à déterminer ensuite la stratégie à adopter pour détecter le C99, directement à partir de l'homogénat de LCR ou après purification des exosomes. Une simple centrifugation à 200 000g pourrait également être envisageable. En accord avec cette stratégie, le Dr Miranda a lui aussi proposé les APP-CTFs comme biomarqueurs du dysfonctionnement endolysosomal-autophagique dans la MA. En effet, le Dr Miranda confirme les nombreux travaux récents suggérant un lien entre le dysfonctionnement endolysosomal-autophagique et la sécrétion exosomale. Dans cette étude, l'inhibition de la Vsp34, qui reproduit la baisse de PIP3 observé chez les patients Alzheimer, induit un dysfonctionnement EAL et la sécrétion d'exosomes particuliers, enrichis en APP-CTFs, en substrat autophagique p62 ainsi qu'en lipides normalement peu présents dans les exosomes, comme la BMP ou le cholestérol, normalement retrouvés dans les lysosomes (MIRANDA et PAOLO, 2018).

En conclusion, nous chercherons donc à déterminer si le C99 est détectable dans les échantillons pathologiques et si ses niveaux corrèlent mieux avec la pathologie que l'A β . Un point important à élucider restera de savoir si le C99 est aussi présent dans le LCR/les exosomes de patients sains ou s'il s'agit en plus d'un marqueur exclusif de la pathologie.

12.3 Combinaison avec d'autres biomarqueurs ?

Pour améliorer le diagnostic, nous proposons également à partir de ces échantillons d'analyser les niveaux de C83, également observé dans les exosomes. D'autre part, plusieurs travaux récents suggèrent un lien entre le dysfonctionnement endolysosomal-autophagique et la sécrétion exosomale, comme évoqué précédemment. L'enrichissement notamment du substrat autophagique p62 dans les exosomes a été observé dans des conditions mimant le dysfonctionnement EAL (inhibition de la VSP34). De la même façon, une étude montre que les exosomes

contenus dans le plasma de patients pré-cliniques de la MA présentent un enrichissement en protéines lysosomales. Nous envisageons donc de combiner le biomarqueur exosomal C99 et/ou C83 avec des biomarqueurs lysosomaux comme les cathepsines B et D, afin d'augmenter la spécificité du diagnostic (GOETZL et al., 2015).

En conclusion, tous ces nouveaux potentiels biomarqueurs (C99? C83? Enzymes lysosomales?) pourraient être nécessaires pour un diagnostic plus précoce et/ou pour une meilleure spécificité du diagnostic, en combinaison avec les biomarqueurs actuels. Outre leur rôle dans le diagnostic, les exosomes pourraient également être envisagés comme des vecteurs thérapeutiques pour la MA. Affaire à suivre...

Conclusion

Pendant très longtemps, la maladie d'Alzheimer a été restreinte à la toxicité du peptide amyloïde. Cependant, après les échecs répétés des essais cliniques visant ce peptide (inhibiteur de sécrétase, immunothérapie...), l'étiologie de la maladie a été reconsidérée, en même temps que les preuves croissantes montrant l'implication du fragment C99.

De nombreuses études ont aujourd'hui démontré la toxicité du C99, qui a été associée à plusieurs phénotypes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (les dysfonctionnements endosomal et lysosomal-autophagique, la pathologie mitochondriale, l'inflammation, les défauts synaptiques et cognitifs). Des études très récentes viennent confirmer son accumulation chez l'Homme et son lien étroit avec le dysfonctionnement endosomal-lysosomal-autophagique, montrant à nouveau son intérêt dans l'étude de la maladie d'Alzheimer.

C'est pourquoi nous proposons aujourd'hui une potentielle cascade du C99, avec en son cœur la boucle pathologique reliant l'accumulation du C99 et le dysfonctionnement endolysosomal-autophagique. Ces altérations sont communes aux formes familiales et sporadiques de la maladie mettant en exergue des mécanismes communs.

Par analogie avec la cascade amyloïde, le C99 pourrait donc être envisagé comme une cible à privilégier pour les futurs essais cliniques. Dans cette optique, j'ai testé une stratégie visant à augmenter sa dégradation par le système lysosomal-autophagique. Les résultats obtenus montrent une forte réduction de l'accumulation du C99 nous confortant dans cette stratégie. Les futures études devront déterminer si l'augmentation de la clairance de ce fragment permet bien d'enrayer ou non la maladie, ce qui redonnerait un nouvel espoir pour un traitement de la maladie d'Alzheimer, qui est aujourd'hui au plus bas.

La deuxième grande difficulté associée à la maladie d'Alzheimer est le manque de diagnostic précoce. Lors de mes travaux de thèse, j'ai également mis en évidence la

présence spécifique de ce fragment C99 et de ses espèces dérivées (C83, oligomères d'APP-CTFs) dans les exosomes issus de modèles cellulaires et murins de la maladie d'Alzheimer. Ces vésicules sécrétées par les neurones se retrouvent dans le milieu extérieur notamment dans le liquide céphalorachidien et leur contenu reflète les changements intracérébraux. En ce sens, le fragment, en plus de représenter une cible thérapeutique, peut se révéler être un marqueur intéressant pour le diagnostic de la maladie d'Alzheimer.

Pour finir et de façon plus générale, cette cascade illustre bien la complexité de la maladie d'Alzheimer, maladie multifactorielle et aux multiples phénotypes toxiques, qui explique probablement aussi les difficultés rencontrées pour trouver un traitement curatif et efficace.

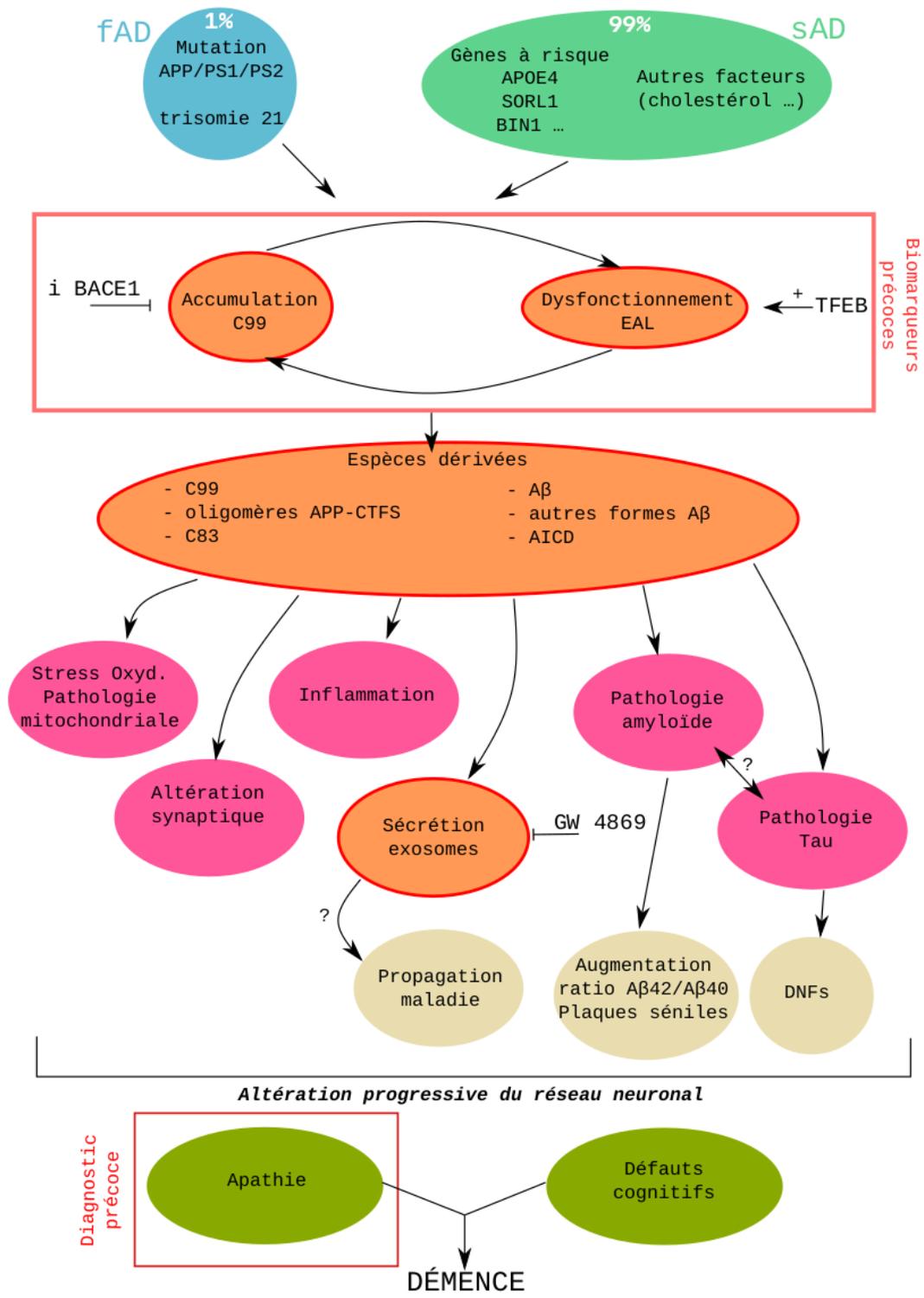


Figure 13.1.: L'hypothétique cascade du C99

Les formes familiales et sporadiques de la maladie d'Alzheimer conduisent à une boucle pathologique dans laquelle l'accumulation du C99 est à la fois la conséquence et la cause du dysfonctionnement endosolysosomal-autophagique. Cette boucle est le point de départ d'un ensemble de perturbations cérébrales qui aboutissent *in fine* à la démence. Les aspects étudiés pendant ma thèse sont indiqués en orange et les biomarqueurs/diagnostic précoces proposés encadrés en rouge. Enfin, différentes stratégies thérapeutiques viennent s'intégrer à cette cascade et sont indiqués en noir.

Annexes

Les tableaux suivants ont pour but de rassembler de façon synthétisée l'ensemble des données et des références abordées au cours dans ce manuscrit pour les sujets suivants :

- les gènes de prédisposition génétique associés aux FAD et en lien avec le système EAL
- le modèle 3xTg-AD
- les données chez les patients Alzheimer
- la toxicité du C99
- la stratégie avec les inhibiteurs β -sécrétase
- la stratégie avec les inhibiteurs γ -sécrétase
- les méthodes d'isolement des exosomes

Gène	Chromosome	Localisation subcellulaire	Fonctions physiologiques	Dérégulations dans la MA
BIN-1	2q14.3	Endos.	endocytose des vésicules synaptiques trafic APP et BACE1 vers Endos. et Lys. stabilisation Tau sur microtubules rôle dans propagation de Tau <i>via</i> Exos.	↓ niveaux protéiques
CD2AP	6p12.3	Endos. précoce	régulation cytosquelette d'actine endocytose et trafic vésicules synaptiques trafic APP des Endos. vers Lys. formation et charge Exos.	pas de fluctuation niveaux protéiques (à ce jour)
CALM	11q14.2	Endos. membrane plasmique	assemblage manteau clathrine initiation autophagie fusion Autophagos. et Lys. tri APP-CTFs vers Autophagos.	↑ ou ↓ niveaux protéiques (en fonction des SNP)
SORL1	11q24.1	Endos. TGN	trafic APP Endos.-Golgi trafic A β vers Lys.	↓ niveaux protéiques (SAD) niveaux normaux (FAD)
PLD3	19q13.2	RE Lys.	dégradation ADN sb dans Exos.	↓ niveaux protéiques
APOE	19q13.32	Endos. TGN membrane plasmique	catabolisme et transport des lipides endocytose lipides et APP transcription APP internalisation A β extrac.	allèle $\epsilon 4$

Tableau 13.1.: Gènes de susceptibilité associés aux FAD en lien avec le système EAL

Tableau récapitulant les facteurs de prédisposition génétique associés aux formes sporadiques de la MA et en lien avec le système EAL. Sont précisées la localisation chromosomale du gène ainsi que la localisation subcellulaire, la fonction physiologique et la dérégulation chez les patients Alzheimer, des protéines codées par ces gènes. Les fonctions physiologiques précisées sont principalement celles en lien avec l'APP ou Tau et la localisation centrée sur les composants du système EAL. Abréviations : Endos. : endosomes; Lys. : Lysosomes; TGN : réseau trans-Golgien; RE : réticulum endoplasmique; Exos. : exosomes; extrac. : extracellulaire
Source : VAN ACKER et al., 2019.

Phénotype	Paramètre étudié	2-3 mois	6 mois	12 mois	20 mois
Pathologie LA	Nombre/Structure	Oui	Oui	Oui	Oui
Pathologie amyloïde	Accumulation C99	+ (Sub)	++	+++ / extrac.	+++ / extrac.
	A β_{40} soluble	ND	↑	↑	↑
	A β_{40} insoluble	ND	ND	↑	↑
	A β_{42} soluble	ND	=	=	↑
	A β_{42} insoluble	ND	↑	↑	↑
Pathologie Tau	Plaques A β	Non	Non	Hipp	Hipp + Ctx
Pathologie Tau	Phosphorylation de Tau	ND	Hipp	Hipp + Ctx	Hipp + Ctx
Astroglie	Intensité GFAP	=	=	↑ (Hipp)	↑
Activation des microglies	Iba1/CD68	=	↑ (Hipp)	↑	↑
Fonction synaptique	LTP	↓	↓	↓	↓
Apathie	Activité spontanée	=	↓	↓	↓
Apprentissage et mémorisation	Piscine de Morris	=	↓	↓	↓

Tableau 13.2.: Modèle 3xTg-AD et phénotypes associés en fonction de l'âge

Tableau récapitulatif les différents phénotypes toxiques retrouvés dans le modèle 3xTg-AD (hAPP^{swe}, hMAPT P301L, PS1 M146V) en fonction de l'âge. Abréviations : pathologie LA : lysosomale-autophagique (augmentation du nombre de vésicules et structures élargies) ; Sub : subiculum ; Hipp : hippocampe ; Ctx : cortex ; ND : non détectable ; extrac. : extracellulaire ; = : pas ou peu de différence avec les souris 3xTg-WT ; ↑ : augmentation du paramètre étudié ; ↓ : diminution du paramètre étudié. Est indiqué entre parenthèse la structure dans laquelle débute la pathologie.

Source : LAURITZEN et al., 2012, LAURITZEN et al., 2016, PARDOSSI-PIQUARD et al., 2016, BOURGEOIS et al., 2018 BELFIORE et al., 2019

Paramètre étudié	FAD		SAD
	APP	PSEN1	
C99	↑ (1)	↑ (1)	↑ (1,2,3)
BACE1	= (1)	= (1)	↑ (1,4)
Dysfonctionnement EAL	Oui (5,6)	Oui (5,6)	Oui (7,8)
γ-sécrétase	?	↓ (9)	?
ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$	= (6) ou variable (10)	↑ (9)	?

Tableau 13.3.: Phénotypes toxiques en lien avec le C99 chez les patients Alzheimer

Tableau récapitulant les variations des différents acteurs de la voie amyloïdogénique et de la fonction endosomale-lysosomale-autophagique chez les patients/modèles des formes familiales ou sporadiques de la MA. Sont indiquées avec un numéro les références des publications traitant de ces données. Les études sur les cas sporadiques étant plus restreintes, les informations manquantes sont indiquées par un : " ? ". Abréviations : = : pas de différence avec les contrôles ; ↑ : augmentation de la protéine et/ou l'activité; ↓ : diminution de l'activité ou du ratio.

(1) PERA et al., 2013 (2) HÉBERT et al., 2008 (3) S. KIM et al., 2016 (4) CHENG et al., 2014 (5) HUNG et LIVESEY, 2018 (6) KWART et al., 2019 (7) A. M. CATALDO et al., 1997 (8) NIXON et al., 2005 (9) L. SUN et al., 2017 (10) (Alzforum)

Stratégie	Modèle	Toxicité	Référence
In vitro	PC12 / C100	dégénérescence sécrétion toxique de C100	YANKNER et al., 1989
	Cos / C100	formation de fibrilles de C100	MARUYAMA et al., 1990
	fibroblastes / C100	agrégation du C100/dépôts	WOLF et al., 1990
	PC12 / C104 (ext.)	liaison du C104 à la surface cellulaire liaison dép. du pH et des résidus tyrosine neurodégénérescence	KOZLOWSKI et al., 1992
	SH-SY5Y / C100	clivage du C100 en A β (maintenu en présence de NH4Cl ou chloroquine)	DYRKS et al., 1993
	P19 / C99	neurotoxicité	FUKUCHI et al., 1993
	neurones avec mutation APP (FAD)	↑ APP-CTFs	MCPHIE et al., 2001
	neurones avec mutation KI PS1 (FAD)	↑ apoptose (C31)	
		↑ APP-CTFs	DEYTS et al., 2019
		↑ cascade CREB	
		↑ sprouting axonal	
Souris C99	transplantation / C100	atrophie du cortex défauts neuropiles	NEVE et al., 1992
	icv / C100	agrégation C100 en intravésiculaire accumulation A β (4 mois) anomalies caractéristiques MA	KAMMESHEIDT et al., 1992
	modèle C100	dégénérescence neuronale (hipp) perte synaptique (hipp) accumulation lysosomes défaut des microglies	OSTER-GRANITE et al., 1996
	modèle C104	↑ gliose activation microgiale perte neuronale (hipp) défauts synaptiques et cognitifs	NALBANTOGLU et al., 1997
	modèles C99***	neurodégénérescence activation giale déficits cognitifs	SATO et al., 1997

Tableau 13.4.: Synthèse des études démontrant la toxicité du C99

Tableau récapitulatif l'ensemble des études ayant démontré la toxicité du C99 dans des modèles *in vitro*, *in vivo* dont plusieurs modèles de la MA ou l'accumulation du C99 chez l'Homme. Pour chaque catégorie, les données sont classées par ordre chronologique et les études négatives quant à l'effet du C99 indiquées par "***". Abréviations : dép : dépendant ; hipp : hippocampe ; ctx : cortex ; sub : subiculum ; acc. : accumulation.

Souris C99	modèle C105	déficits cognitifs réactivité gliale neurodégénérescence	D. K. SONG et al., 1998	
	modèle C100	déficits cognitifs neurodégénérescence phénotype plus fort chez femelles	BERGER-SWENEY et al., 1999	
	modèle C105	déficits cognitifs déficits cholinergiques dysfonctionnement mitochondriales	CHOI et al., 2001	
	modèle CT105 (rat)	défaut mémoire de travail	MATSUMOTO et al., 2002	
	modèle SPA4CT*** C99 muté ($\downarrow A\beta$)	pas de dégénérescence pas de perte synaptique	RUTTEN et al., 2003	
	modèle Tg β CTF/B6	\uparrow marqueurs apoptotiques pertes neuronales déficits cognitifs anxiété	K.-W. LEE et al., 2006	
	modèle Tg13592	déficits cognitifs altérations cholinergiques (\uparrow AchE)	DUMONT et al., 2006	
	modèle AAV10-C99	pathologie lysosomale-autophagique défauts synaptiques activation microgliale C99 oligomérique dans exosomes	Lauritzen et al., 2016 Lauritzen et al., 2019	
	Souris avec mutants FAD	modèle 3xTg-AD (APP ^{swe} , MAPT P301L, PS1 M146V)	acc. C99 dès 3 mois (sub) dysfonctionnement LA comportement apathique défauts synaptiques défauts cognitifs activation astrocytaire	Lauritzen et al., 2012 Pardossi-Piquard et al., 2016 Bourgeois et al., 2018
			secrétion exosomale d'oligomères C99	Lauritzen et al., 2019

Tableau 13.5.: Synthèse des études démontrant la toxicité du C99 (suite)

Tableau récapitulatif l'ensemble des études ayant démontré la toxicité du C99 dans des modèles *in vitro*, *in vivo* dont plusieurs modèles de la MA ou l'accumulation du C99 chez l'Homme. Pour chaque catégorie, les données sont classées par ordre chronologique et les études négatives quant à l'effet du C99 indiquées par "***". Abréviations : dép : dépendant ; hipp : hippocampe ; ctx : cortex ; sub : subiculum ; acc. : accumulation.

Souris avec mutants FAD	modèle 2xTg-AD (APPswe, MAPT P301L)	acc. C99 dès 3 mois (sub) dysfonctionnement LA comportement apathique défauts synaptiques	LAURITZEN et al., 2012 PARDOSSI-PIQUARD et al., 2016 BOURGEOIS et al., 2018 CAVANAGH et al., 2013
	modèle Tg CRND8 (APPswe, APPind)	acc. C99 dès 30J ↑ TNF α activation microgliale	
		altération des ondes θ - γ (hipp) altération activité oscillatoire (hipp) défauts cognitifs	GOUTAGNY et al., 2013 HAMM et al., 2017
	modèle Tg APP E693Q	acc. C99 dans lysosomes dysfonction lysosomale perte neuronale (hipp, ctx, c. antérieur) gliose (hipp)	KAUR et al., 2017
Souris KI FAD	modèle J20 (APPswe, APPind)	acc. C99 dès 30J déficits synaptiques (cellules PV) altérations oscillations θ	MONDRAGÓN-RODRÍGUEZ et al., 2018
	modèle APP NL ^{***} (APPswe)	acc. C99 pas défaut cognitif activation microgliale	SAITO et al., 2014
	modèle APP NL-F (APPswe, APPibérique)	acc. C99 défauts cognitifs activation microgliale	SAITO et al., 2014
Chez l'Homme	patients Alzheimer patients SAD	acc. "APP" dans organelles élargis ↑ C99 (cerveau) ↑ activité BACE1 (cerveau) ↑ miR 29a/b1	BENOWITZ et al., 1989 HÉBERT et al., 2008
	patients FAD patients SAD	↑ C99 (cerveau) pas de modification de l'activité BACE1 (cerveau) ↑ C99 (cerveau) mais plus faible que FAD ↑ activité BACE1 (cerveau)	PERA et al., 2013

Tableau 13.6.: Synthèse des études démontrant la toxicité du C99 (suite)

Tableau récapitulatif l'ensemble des études ayant démontré la toxicité du C99 dans des modèles *in vitro*, *in vivo* dont plusieurs modèles de la MA ou l'accumulation du C99 chez l'Homme. Pour chaque catégorie, les données sont classées par ordre chronologique et les études négatives quant à l'effet du C99 indiquées par "***". Abréviations : dép : dépendant; hipp : hippocampe; ctx : cortex; sub : subiculum; acc. : accumulation.

Chez l'Homme	patients SAD	↑ C99 (cerveau) endosomes élargis ↑ APPL1	S. KIM et al., 2016
	patients SAD et FAD	↑ C99 (LCR) APP-CTF à 25kDa majoritaire (LCR)	GARCÍA-AYLLÓN et al., 2017
	neurones dérivés iPSC FAD (APP ou PSEN1)	acc. C99 dysfonctionnement LA	HUNG et LIVESEY, 2018
	neurones dérivés iPSC mutations APP et/ou PSEN1	acc. C99 altérations endosomales	KWART et al., 2019
	patients SAD	acc. C99 (cerveau) vulnérabilité des neurones	PULINA et al., 2019

Tableau 13.7.: Synthèse des études démontrant la toxicité du C99 (suite)

Tableau récapitulant l'ensemble des études ayant démontré la toxicité du C99 dans des modèles *in vitro*, *in vivo* dont plusieurs modèles de la MA ou l'accumulation du C99 chez l'Homme. Pour chaque catégorie, les données sont classées par ordre chronologique et les études négatives quant à l'effet du C99 indiquées par "**:*". Abréviations : dép : dépendant; hipp : hippocampe; ctx : cortex; sub : subiculum; acc. : accumulation.

Stratégie	Modèle	Effets	Référence
Mutations APP mutation M596V	neurone / APP london	réduit clivage β -sécrétase ↓ C99	McPHIE et al., 2001
mutation islandaise (APP A673T)	population islandaise <i>in vitro</i> personnes âgées neurones primaires ou dérivés d'iPSC humaines neurones dérivés iPSC	réduit phénotype apoptotique protection contre MA ↓ A β prévient contre déclin cognitif réduit clivage β -sécrétase ↓ C99	JONSSON et al., 2012 MALONEY et al., 2014
mutation islandaise Délétion BACE1 BACE1-/- BACE1 +/- BACE1 +/-	souris APPswe/PS1dE9 souris PDAPP (APPind) souris trisomiques (Ts2)	réverse défauts endosomaux réverse déficits cognitifs réverse déficits synaptiques ↓ APP-CITs améliore dysfonctionnement endosomal ↓ neurodégénérescence cholinergique	KWART et al., 2019 LAIRD et al., 2005 MCCONLOGUE et al., 2007 Y. JIANG et al., 2016
Inhibiteur β-sécrétase inhibiteur IV	modèle de démence (FDD)	restauration de l'activité synaptique amélioration des défauts cognitifs	TAMAYEV et al., 2012
LY2811376	souris Tg CRND8	réverse défauts mémoire activation hippocampique	HAMM et al., 2017
AZD3839	souris J20 (APPswe, APPind)	améliore déficits synaptiques restaure oscillations théta	MONDRAGÓN-RODRÍGUEZ et al., 2018
OM99-2	neurones dérivés iPSC FAD (APP ou PSEN1)	réverse défauts LA améliore dégradation	HUNG et LIVESEY, 2018
inhibiteur IV	neurones dérivés iPSC mutations APP et/ou PSEN1	réverse défauts endosomaux	KWART et al., 2019

Tableau 13.8.: Arguments en faveur d'une inhibition de la β -sécrétase comme stratégie thérapeutique pour la MA

Tableau listant un ensemble d'études montrant les effets positifs d'une inhibition de la β -sécrétase dans différents modèles Alzheimer ou apparentés.

Il faut noter que, malgré les effets positifs de cette stratégie démontrés dans ces travaux, l'utilisation d'inhibiteurs β -sécrétase chez les patients Alzheimer n'a pas permis une amélioration des fonctions cognitives.

Stratégie	Modèle	Effets	Référence
Invalidations des PS PS1-/-	Souris	défauts développementaux mortalité périnatale	DONOVIEL et al., 1999
PS2-/- PS1-/- PS2+/-	Souris Souris	pas de défaut développementaux mort embryonnaire	HERREMAN et al., 1999
PS2-/- PS1 +/- PS2-/-	Souris pas de phénotype délétère apparent	viable, fertile, légers défauts pulmonaire	
Mutations APP mutation ins625-628 ou 6637C	neurone APPswe	inhibe γ -sécrétase phénotype apoptotique maintenu	MCPHIE et al., 2001
inhibiteur γ-sécrétase DAPT ou semagacestate composé E	souris sauvages modèle de démence (FDD)	↓ densité épine dendritique ↑ APP-CTFs ne restaure pas la fonction synaptique n'améliore pas la mémoire	BITTNER et al., 2009 TAMAYEV et al., 2012
semagacestate ou avagacestate	souris Tg 2576 (APPswe) souris sauvages	↑ C99 n'améliore pas fonctions cognitives altérations cognitives	MITANI et al., 2012
D6	souris 3xTg-AD ou AAV10-C99	↑ niveaux de C99 exacerbe pathologie LA exacerbe la neuroinflammation ↑ C99 oligomérique dans exosomes	LAURITZEN et al., 2016 LAURITZEN et al., 2019
semagacestate	souris Tg CRND8	↑ niveaux de C99 ne reverse pas fonctions cognitives	HAMM et al., 2017

Tableau 13.9.: Arguments contre une inhibition de la γ -sécrétase comme stratégie thérapeutique pour la MA

Tableau listant un ensemble d'études montrant les effets négatifs d'une inhibition de la γ -sécrétase dans différents modèles Alzheimer ou apparentés.

La recherche actuelle se tourne vers des modulateurs de la γ -sécrétase, permettant de maintenir une activité γ -sécrétase mais de favoriser la production d' $A\beta$ de plus courte taille.

DAPT	neurones dérivés iPSC sains	↑ APP-CTFs induit pathologie LA	HUNG et LIVESSEY, 2018
composé E	neurones dérivés iPSC sains	↑ APP-CTFs induit pathologie endosomale	KWART et al., 2019
avagestate	patients Alzheimer (léger à modéré)	effets secondaires importants (gastrointestinaux, dermatologiques, cancer peau) aggravation fonctions cognitives	CORIC et al., 2012
semagestate	patients Alzheimer (léger à modéré)	effets secondaires importants (gastrointestinaux, cancer peau) aggravation fonctions cognitives	DOODY et al., 2013

Tableau 13.10.: Arguments contre une inhibition de la γ -sécrétase comme stratégie thérapeutique pour la MA (suite)

Tableau listant un ensemble d'études montrant les effets négatifs d'une inhibition de la γ -sécrétase dans différents modèles Alzheimer ou apparentés.

La recherche actuelle se tourne vers des modulateurs de la γ -sécrétase, permettant de maintenir une activité γ -sécrétase mais de favoriser la production d'A β de plus courte taille.

Méthode	Principe	Avantages	Inconvénients
Ultracentrifugation différentielle	- en fonction de la taille et densité - centrifugations à différentes forces et différentes durées	- simple à mettre en place - analyses RNA seq et SM et acides nucléiques	- méthode longue - contamination agrégats protéiques → étape lavage supplémentaire - pas appropriée pour petits volumes
sur gradient de densité	- en fonction de la taille, masse et densité	- améliore le rendement - sépare exosomes des agrégats protéiques et microvésicules	- étape de lavage (élimination du gradient)
Chromatographie d'exclusion stérique (SEC)	- en fonction du volume hydrodynamique	- facile - rapide - petits volumes - 1 seul kit pour tout type d'échantillon	- faible concentration → étape supplémentaire d'enrichissement
Ultrafiltration	- en fonction de la taille ou poids mol. - utilisation de membrane semi-perméable	- facile - rapide - petits volumes - analyses RNA seq et SM	- entraîne déformation des vésicules (passage dans filtre) - petits volumes
Précipitation par polymères	- en fonction solubilité - précipitation grâce à des polymères hydrophiles (PEG) - précipitation des éléments des moins solubles (exosomes)	- facile - rapide - petits volumes - haut rendement	- contaminations diverses (PEG, protéines sérum, microvésicules...) → couplé à filtration - pas approprié pour SM
Immunoaffinité	- billes magnétiques couplées à Ac (spécifique des marqueurs exos.) (CD9, CD63, CD81)	- facile - pas d'agent chimique - 1 seule étape - analyses RNA seq et SM	- faible rendement - petits volumes

Tableau 13.11.: Méthodes d'isolement des exosomes, avantages et inconvénients

Tableau récapitulant les différentes méthodes de purification des exosomes ainsi que leurs avantages et leurs inconvénients. La majorité des techniques d'isolement des exosomes sont basées une séparation en fonction de leur taille, leur masse ou leur densité (haut du tableau) ; une autre méthode permet une séparation en fonction de l'expression des marqueurs spécifiques exosomaux (bas du tableau). Il existe des kits commerciaux pour l'ensemble de méthodes, sauf l'ultracentrifugation. Abréviations : SM : spectrométrie de masse ; Ac : anticorps.

Source : PATEL et al., 2019

Bibliographie

- ACQUATI, F., M. ACCARINO, C. NUCCI et al. (18 fév. 2000). « The gene encoding DRAP (BACE2), a glycosylated transmembrane protein of the aspartic protease family, maps to the down critical region ». In : *FEBS letters* 468.1, p. 59-64 (cf. p. 45).
- AGHSAMI, M., M. SHARIFZADEH, M. R. SEPAND et al. (2018). « A cAMP analog attenuates beta-amyloid (1-42)-induced mitochondrial dysfunction and spatial learning and memory deficits ». In : *Brain Research Bulletin* 140, p. 34-42 (cf. p. 121).
- ALVES DA COSTA, C., C. SUNYACH, R. PARDOSSI-PIQUARD et al. (7 juin 2006). « Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26.23, p. 6377-6385 (cf. p. 55).
- ALZHEIMER, A., R. A. STELZMANN, H. N. SCHNITZLEIN et F. R. MURTAGH (1995). « An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde" ». In : *Clinical Anatomy (New York, N.Y.)* 8.6, p. 429-431 (cf. p. 10, 16, 59).
- ANDERSEN, O. M., J. REICHE, V. SCHMIDT et al. (20 sept. 2005). « Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102.38, p. 13461-13466 (cf. p. 62).
- AREA-GOMEZ, E. et E. A. SCHON (2017). « On the Pathogenesis of Alzheimer's Disease : The MAM Hypothesis ». In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 31.3, p. 864-867 (cf. p. 80).
- ARELLANO-ANAYA, Z. E., A. HUOR, P. LEBLANC et al. (mar. 2015). « Prion strains are differentially released through the exosomal pathway ». In : *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 72.6, p. 1185-1196 (cf. p. 194).
- ASAI, H., S. IKEZU, S. TSUNODA et al. (nov. 2015). « Depletion of microglia and inhibition of exosome synthesis halt tau propagation ». In : *Nature neuroscience* 18.11, p. 1584-1593 (cf. p. 196).
- ASAI, M., S. YAGISHITA, N. IWATA et al. (oct. 2011). « An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model ». In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 25.10, p. 3720-3730 (cf. p. 104, 237).

- AUDAGNOTTO, M., T. LEMMIN, A. BARDUCCI et M. DAL PERARO (15 sept. 2016). « Effect of the Synaptic Plasma Membrane on the Stability of the Amyloid Precursor Protein Homodimer ». In : *The Journal of Physical Chemistry Letters* 7.18, p. 3572-3578 (cf. p. 245).
- AVRAHAMI, L., D. FARFARA, M. SHAHAM-KOL et al. (11 jan. 2013). « Inhibition of glycogen synthase kinase-3 ameliorates β -amyloid pathology and restores lysosomal acidification and mammalian target of rapamycin activity in the Alzheimer disease mouse model : in vivo and in vitro studies ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 288.2, p. 1295-1306 (cf. p. 169).
- BAGAD, D. M., D. CHOWDHURY et Z. KHAN (1^{er} oct. 2013). « Towards understanding Alzheimer's Disease : An Overview ». In : *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences* 4, p. 286-298 (cf. p. 17).
- BAHR, B. A., M. L. WISNIEWSKI et D. BUTLER (avr. 2012). « Positive lysosomal modulation as a unique strategy to treat age-related protein accumulation diseases ». In : *Rejuvenation Research* 15.2, p. 189-197 (cf. p. 120).
- BAIETTI, M. F., Z. ZHANG, E. MORTIER et al. (3 juin 2012). « Syndecan-syntenin-ALIX regulates the biogenesis of exosomes ». In : *Nature Cell Biology* 14.7, p. 677-685 (cf. p. 184).
- BAIXAULI, F., C. LÓPEZ-OTÍN et M. MITTELBRUNN (2014). « Exosomes and autophagy : coordinated mechanisms for the maintenance of cellular fitness ». In : *Frontiers in Immunology* 5, p. 403 (cf. p. 191).
- BALLABIO, A. (1^{er} fév. 2016). « The awesome lysosome ». In : *EMBO Molecular Medicine* 8.2, p. 73-76 (cf. p. 128).
- BAO, J., L. ZHENG, Q. ZHANG et al. (juin 2016). « Deacetylation of TFEB promotes fibrillar A β degradation by upregulating lysosomal biogenesis in microglia ». In : *Protein & Cell* 7.6, p. 417-433 (cf. p. 128, 133).
- BARANGER, K., Y. MARCHALANT, A. E. BONNET et al. (jan. 2016). « MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease ». In : *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 73.1, p. 217-236 (cf. p. 42, 43).
- BAUMKÖTTER, F., N. SCHMIDT, C. VARGAS et al. (13 août 2014). « Amyloid precursor protein dimerization and synaptogenic function depend on copper binding to the growth factor-like domain ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34.33, p. 11159-11172 (cf. p. 36).
- BAYER, T. A. et O. WIRTHS (10 mar. 2010). « Intracellular Accumulation of Amyloid-Beta – A Predictor for Synaptic Dysfunction and Neuron Loss in Alzheimer's Disease ». In : *Frontiers in Aging Neuroscience* 2 (cf. p. 54).

- BEDNARSKI, E. et G. LYNCH (nov. 1996). « Cytosolic proteolysis of tau by cathepsin D in hippocampus following suppression of cathepsins B and L ». In : *Journal of Neurochemistry* 67.5, p. 1846-1855 (cf. p. 96).
- BEEL, A. J., M. SAKAKURA, P. J. BARRETT et C. R. SANDERS (août 2010). « Direct Binding of Cholesterol to the Amyloid Precursor Protein : An Important Interaction in Lipid-Alzheimer's Disease Relationships? » In : *Biochimica et biophysica acta* 1801.8, p. 975-982 (cf. p. 244).
- BELFIORE, R., A. RODIN, E. FERREIRA et al. (fév. 2019). « Temporal and regional progression of Alzheimer's disease-like pathology in 3xTg-AD mice ». In : *Aging Cell* 18.1 (cf. p. 269).
- BELLINGHAM, S. A., B. B. GUO, B. M. COLEMAN et A. F. HILL (2012). « Exosomes : vehicles for the transfer of toxic proteins associated with neurodegenerative diseases? » In : *Frontiers in Physiology* 3, p. 124 (cf. p. 186).
- BENNETT, B. D., S. BABU-KHAN, R. LOELOFF et al. (7 juil. 2000). « Expression analysis of BACE2 in brain and peripheral tissues ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 275.27, p. 20647-20651 (cf. p. 45).
- BENOWITZ, L. I., W. RODRIGUEZ, P. PASKEVICH et al. (déc. 1989). « The amyloid precursor protein is concentrated in neuronal lysosomes in normal and Alzheimer disease subjects ». In : *Experimental Neurology* 106.3, p. 237-250 (cf. p. 273).
- BERGER-SWEENEY, J., D. L. MCPHIE, J. A. ARTERS et al. (20 mar. 1999). « Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein ». In : *Brain Research. Molecular Brain Research* 66.1, p. 150-162 (cf. p. 272).
- BEST, J. D., D. W. SMITH, M. A. REILLY et al. (fév. 2007). « The novel gamma secretase inhibitor N-[cis-4-[(4-chlorophenyl)sulfonyl]-4-(2,5-difluorophenyl)cyclohexyl]-1,1,1-trifluoromethanesulfonamide (MRK-560) reduces amyloid plaque deposition without evidence of notch-related pathology in the Tg2576 mouse ». In : *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 320.2, p. 552-558 (cf. p. 247).
- BEYREUTHER, K. et C. L. MASTERS (juil. 1991). « Amyloid precursor protein (APP) and beta A4 amyloid in the etiology of Alzheimer's disease : precursor-product relationships in the derangement of neuronal function ». In : *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)* 1.4, p. 241-251 (cf. p. 65).
- BILLINGS, L. M., S. ODDO, K. N. GREEN, J. L. MCGAUGH et F. M. LAFERLA (mar. 2005). « Intraneuronal A β Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice ». In : *Neuron* 45.5, p. 675-688 (cf. p. 74).
- BISCHOF, G. N., F. JESSEN, K. FLIESSBACH et al. (2016). « Impact of tau and amyloid burden on glucose metabolism in Alzheimer's disease ». In : *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3.12, p. 934-939 (cf. p. 71).

- BISSIG, C. et J. GRUENBERG (1^{er} oct. 2013). « Lipid sorting and multivesicular endosome biogenesis ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5.10, a016816 (cf. p. 201).
- BITTNER, T., M. FUHRMANN, S. BURGOLD et al. (19 août 2009). « Gamma-secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29.33, p. 10405-10409 (cf. p. 276).
- BLENNOW, K. et H. ZETTERBERG (2018). « Biomarkers for Alzheimer's disease : current status and prospects for the future ». In : *Journal of Internal Medicine* 284.6, p. 643-663 (cf. p. 29).
- BOLAND, B., D. A. SMITH, D. MOONEY et al. (26 nov. 2010). « Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 285.48, p. 37415-37426 (cf. p. 104, 237).
- BOLAND, B., W. H. YU, O. CORTI et al. (sept. 2018). « Promoting the clearance of neurotoxic proteins in neurodegenerative disorders of aging ». In : *Nature reviews. Drug discovery* 17.9, p. 660-688 (cf. p. 104, 255).
- BOLSHAKOVA, O. I., A. A. ZHUK, D. I. RODIN, G. A. KISLIK et S. V. SARANTSEVA (1^{er} mar. 2014). « Effect of human APP gene overexpression on *Drosophila melanogaster* cholinergic and dopaminergic brain neurons ». In : *Russian Journal of Genetics : Applied Research* 4.2, p. 113-121 (cf. p. 69).
- BORDI, M., M. J. BERG, P. S. MOHAN et al. (4 nov. 2016). « Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus : Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy ». In : *Autophagy* 12.12, p. 2467-2483 (cf. p. 113, 131, 176).
- BOTEV, A., L.-M. MUNTER, R. WENZEL et al. (8 fév. 2011). « The amyloid precursor protein C-terminal fragment C100 occurs in monomeric and dimeric stable conformations and binds γ -secretase modulators ». In : *Biochemistry* 50.5, p. 828-835 (cf. p. 243).
- BOURDENX, M., J. DANIEL, E. GENIN et al. (2016). « Nanoparticles restore lysosomal acidification defects : Implications for Parkinson and other lysosomal-related diseases ». In : *Autophagy* 12.3, p. 472-483 (cf. p. 121).
- BOURGOIS, A., I. LAURITZEN, T. LORIVEL et al. (nov. 2018). « Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3×TgAD and 2×TgAD mice ». In : *Neurobiology of Aging* 71, p. 21-31 (cf. p. 240, 269, 272, 273).
- BOVE, R., E. SECOR, L. B. CHIBNIK et al. (21 jan. 2014). « Age at surgical menopause influences cognitive decline and Alzheimer pathology in older women ». In : *Neurology* 82.3, p. 222-229 (cf. p. 22).

- BRAAK, H. et E. BRAAK (août 1997). « Frequency of stages of Alzheimer-related lesions in different age categories ». In : *Neurobiology of Aging* 18.4, p. 351-357 (cf. p. 70).
- (1991). « Neuropathological staging of Alzheimer-related changes ». In : *Acta Neuropathologica* 82.4, p. 239-259 (cf. p. 13, 70).
- BRAAK, H., I. ALAFUZOFF, T. ARZBERGER, H. KRETZSCHMAR et K. DEL TREDICI (oct. 2006). « Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry ». In : *Acta Neuropathologica* 112.4, p. 389-404 (cf. p. 13, 14, 70).
- BRASKIE, M. N. et P. M. THOMPSON (oct. 2013). « Understanding cognitive deficits in Alzheimer's disease based on neuroimaging findings ». In : *Trends in Cognitive Sciences* 17.10, p. 510-516 (cf. p. 30).
- BRION, J. P., H. PASSAREIRO, J. NUNEZ et J. FLAMENT DURAND (1985). « Mise en évidence immunologique de la protéine tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer ». In : *Archives de biologie* 95, p. 229-235 (cf. p. 10).
- BROSCH, J. R., M. R. FARLOW, S. L. RISACHER et L. G. APOSTOLOVA (jan. 2017). « Tau Imaging in Alzheimer's Disease Diagnosis and Clinical Trials ». In : *Neurotherapeutics* 14.1, p. 62-68 (cf. p. 30).
- BROTHERS, H. M., M. L. GOSZTYLA et S. R. ROBINSON (25 avr. 2018). « The Physiological Roles of Amyloid- β Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease ». In : *Frontiers in Aging Neuroscience* 10 (cf. p. 55).
- BUKHARI, H., A. GLOTZBACH, K. KOLBE et al. (sept. 2017). « Small things matter : Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease ». In : *Progress in Neurobiology* 156, p. 189-213 (cf. p. 56).
- BULLOJ, A., M. C. LEAL, H. XU, E. M. CASTAÑO et L. MORELLI (2010). « Insulin-degrading enzyme sorting in exosomes : a secretory pathway for a key brain amyloid-beta degrading protease ». In : *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 19.1, p. 79-95 (cf. p. 200).
- BURSAVICH, M. G., B. A. HARRISON et J.-F. BLAIN (25 août 2016). « Gamma Secretase Modulators : New Alzheimer's Drugs on the Horizon ? » In : *Journal of Medicinal Chemistry* 59.16, p. 7389-7409 (cf. p. 248).
- BUSTAMANTE, H. A., A. RIVERA-DICTTER, V. A. CAVIERES et al. (2013). « Turnover of C99 is controlled by a crosstalk between ERAD and ubiquitin-independent lysosomal degradation in human neuroglioma cells ». In : *PloS One* 8.12, e83096 (cf. p. 92).
- BUTLER, D., J. HWANG, C. ESTICK et al. (2011). « Protective effects of positive lysosomal modulation in Alzheimer's disease transgenic mouse models ». In : *PloS One* 6.6, e20501 (cf. p. 120).

- CACCAMO, A., E. FERREIRA, C. BRANCA et S. ODDO (2017). « p62 improves AD-like pathology by increasing autophagy ». In : *Molecular Psychiatry* 22.6, p. 865-873 (cf. p. 124).
- CACCAMO, A., V. DE PINTO, A. MESSINA, C. BRANCA et S. ODDO (4 juin 2014). « Genetic reduction of mammalian target of rapamycin ameliorates Alzheimer's disease-like cognitive and pathological deficits by restoring hippocampal gene expression signature ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 34.23, p. 7988-7998 (cf. p. 122).
- CACCAMO, A., S. MAJUMDER, A. RICHARDSON, R. STRONG et S. ODDO (23 avr. 2010). « Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau : effects on cognitive impairments ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 285.17, p. 13107-13120 (cf. p. 122).
- CACCAMO, A., S. ODDO, M. C. SUGARMAN, Y. AKBARI et F. M. LAFERLA (mai 2005). « Age- and region-dependent alterations in Abeta-degrading enzymes : implications for Abeta-induced disorders ». In : *Neurobiology of Aging* 26.5, p. 645-654 (cf. p. 56).
- CARONI, P. (jan. 1997). « Overexpression of growth-associated proteins in the neurons of adult transgenic mice ». In : *Journal of Neuroscience Methods* 71.1, p. 3-9 (cf. p. 65).
- CASTRO, M. A., A. HADZISELIMOVIC et C. R. SANDERS (juil. 2019). « The vexing complexity of the amyloidogenic pathway ». In : *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 28.7, p. 1177-1193 (cf. p. 49).
- CATALDO, A. M., C. M. PETERHOFF, J. C. TRONCOSO et al. (juil. 2000). « Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome : differential effects of APOE genotype and presenilin mutations ». In : *The American Journal of Pathology* 157.1, p. 277-286 (cf. p. 110, 111).
- CATALDO, A., G. W. REBECK, B. GHETRI et al. (nov. 2001). « Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease and related disorders ». In : *Annals of Neurology* 50.5, p. 661-665 (cf. p. 110).
- CATALDO, A. M., J. L. BARNETT, C. PIERONI et R. A. NIXON (15 août 1997). « Increased Neuronal Endocytosis and Protease Delivery to Early Endosomes in Sporadic Alzheimer's Disease : Neuropathologic Evidence for a Mechanism of Increased β -Amyloidogenesis ». In : *Journal of Neuroscience* 17.16, p. 6142-6151 (cf. p. 107, 270).
- CAVANAGH, C., J. COLBY-MILLEY, D. BOUVIER et al. (2013). « β CTF-correlated burst of hippocampal TNF α occurs at a very early, pre-plaque stage in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ». In : *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 36.2, p. 233-238 (cf. p. 77, 273).
- CHAKRABARTY, P., A. ROSARIO, P. CRUZ et al. (25 juin 2013). « Capsid Serotype and Timing of Injection Determines AAV Transduction in the Neonatal Mice Brain ». In : *PLoS ONE* 8.6 (cf. p. 162, 163).

- CHEN, G.-f., T.-h. XU, Y. YAN et al. (sept. 2017). « Amyloid beta : structure, biology and structure-based therapeutic development ». In : *Acta Pharmacologica Sinica* 38.9, p. 1205-1235 (cf. p. 12, 37).
- CHENG, X., P. HE, T. LEE et al. (1^{er} jan. 2014). « High Activities of BACE1 in Brains with Mild Cognitive Impairment ». In : *The American Journal of Pathology* 184.1, p. 141-147 (cf. p. 270).
- CHIANG, W.-C., Y. WEI, Y.-C. KUO et al. (2018). « High-Throughput Screens To Identify Autophagy Inducers That Function by Disrupting Beclin 1/Bcl-2 Binding ». In : *ACS chemical biology* 13.8, p. 2247-2260 (cf. p. 123).
- CHISHTI, M. A., D. S. YANG, C. JANUS et al. (15 juin 2001). « Early-onset amyloid deposition and cognitive deficits in transgenic mice expressing a double mutant form of amyloid precursor protein 695 ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 276.24, p. 21562-21570 (cf. p. 66).
- CHO, Y. Y., O.-H. KWON, M. K. PARK, T.-W. KIM et S. CHUNG (2019). « Elevated cellular cholesterol in Familial Alzheimer's presenilin 1 mutation is associated with lipid raft localization of β -amyloid precursor protein ». In : *PloS One* 14.1, e0210535 (cf. p. 59).
- CHOI, S. H., C. H. PARK, J. W. KOO et al. (août 2001). « Memory impairment and cholinergic dysfunction by centrally administered Abeta and carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's APP in mice ». In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 15.10, p. 1816-1818 (cf. p. 272).
- COEN, K., R. S. FLANNAGAN, S. BARON et al. (9 juil. 2012). « Lysosomal calcium homeostasis defects, not proton pump defects, cause endo-lysosomal dysfunction in PSEN-deficient cells ». In : *The Journal of Cell Biology* 198.1, p. 23-35 (cf. p. 115).
- COFFEY, E. E., J. M. BECKEL, A. M. LATIES et C. H. MITCHELL (28 mar. 2014). « Lysosomal alkalization and dysfunction in human fibroblasts with the Alzheimer's disease-linked presenilin 1 A246E mutation can be reversed with cAMP ». In : *Neuroscience* 263, p. 111-124 (cf. p. 121).
- COLACURCIO, D. J., A. PENSALFINI, Y. JIANG et R. A. NIXON (jan. 2018). « Dysfunction of Autophagy and Endosomal-Lysosomal Pathways : Roles in Pathogenesis of Down Syndrome and Alzheimer's Disease ». In : *Free radical biology & medicine* 114, p. 40-51 (cf. p. 116, 249).
- COLOMBO, M., G. RAPOSO et C. THÉRY (2014). « Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles ». In : *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 30, p. 255-289 (cf. p. 185, 189).

- COMERY, T. A., R. L. MARTONE, S. ASCHMIES et al. (28 sept. 2005). « Acute gamma-secretase inhibition improves contextual fear conditioning in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25.39, p. 8898-8902 (cf. p. 247).
- CORDER, E. H., A. M. SAUNDERS, W. J. STRITTMATTER et al. (13 août 1993). « Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families ». In : *Science (New York, N.Y.)* 261.5123, p. 921-923 (cf. p. 24).
- CORIC, V., C. H. van DYCK, S. SALLOWAY et al. (nov. 2012). « Safety and tolerability of the γ -secretase inhibitor avagacestat in a phase 2 study of mild to moderate Alzheimer disease ». In : *Archives of Neurology* 69.11, p. 1430-1440 (cf. p. 247, 277).
- COUPÉ, P., J. V. MANJÓN, E. LANUZA et G. CATHELIN (déc. 2019). « Lifespan Changes of the Human Brain In Alzheimer's Disease ». In : *Scientific Reports* 9.1, p. 3998 (cf. p. 13).
- DAHMS, S. O., S. HOEFGEN, D. ROESER et al. (23 mar. 2010). « Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.12, p. 5381-5386 (cf. p. 36).
- DAVID, R., E. MULIN, L. FRIEDMAN et al. (sept. 2012). « Decreased daytime motor activity associated with apathy in Alzheimer disease : an actigraphic study ». In : *The American Journal of Geriatric Psychiatry : Official Journal of the American Association for Geriatric Psychiatry* 20.9, p. 806-814 (cf. p. 9).
- DAVIES, C. A., D. M. MANN, P. Q. SUMPTER et P. O. YATES (avr. 1987). « A quantitative morphometric analysis of the neuronal and synaptic content of the frontal and temporal cortex in patients with Alzheimer's disease ». In : *Journal of the Neurological Sciences* 78.2, p. 151-164 (cf. p. 15).
- DE STROOPER, B. (fév. 2007). « Loss-of-function presenilin mutations in Alzheimer disease. Talking Point on the role of presenilin mutations in Alzheimer disease ». In : *EMBO Reports* 8.2, p. 141-146 (cf. p. 236).
- DE STROOPER, B., T. IWATSUBO et M. S. WOLFE (jan. 2012). « Presenilins and γ -secretase : structure, function, and role in Alzheimer Disease ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2.1, a006304 (cf. p. 49).
- DE STROOPER, B., R. VASSAR et T. GOLDE (fév. 2010). « The secretases : enzymes with therapeutic potential in Alzheimer disease ». In : *Nature reviews. Neurology* 6.2, p. 99-107 (cf. p. 46, 250).
- De DUVE, C., B. C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. WATTIAUX et F. APPELMANS (1^{er} août 1955). « Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue* ». In : *Biochemical Journal* 60.4, p. 604-617 (cf. p. 94).

- De WILDE, M. C., C. R. OVERK, J. W. SIJBEN et E. MASLIAH (juin 2016). « Meta-analysis of synaptic pathology in Alzheimer's disease reveals selective molecular vesicular machinery vulnerability ». In : *Alzheimer's & Dementia* 12.6, p. 633-644 (cf. p. 15).
- DECOCK, M., L. EL HAYLANI, S. STANGA et al. (2015). « Analysis by a highly sensitive split luciferase assay of the regions involved in APP dimerization and its impact on processing ». In : *FEBS open bio* 5, p. 763-773 (cf. p. 243-245).
- DECOCK, M., S. STANGA, J.-N. OCTAVE et al. (2016). « Glycines from the APP GXXXG/GXXXA Transmembrane Motifs Promote Formation of Pathogenic A β Oligomers in Cells ». In : *Frontiers in Aging Neuroscience* 8, p. 107 (cf. p. 244).
- DECRESSAC, M., B. MATTSSON, P. WEIKOP et al. (7 mai 2013). « TFEB-mediated autophagy rescues midbrain dopamine neurons from -synuclein toxicity ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.19, E1817-E1826 (cf. p. 130, 168).
- DEHAY, B., J. BOVÉ, N. RODRÍGUEZ-MUELA et al. (15 sept. 2010). « Pathogenic Lysosomal Depletion in Parkinson's Disease ». In : *The Journal of Neuroscience* 30.37, p. 12535-12544 (cf. p. 169).
- DEL PRETE, D., J. M. SUSKI, B. OULÈS et al. (2017). « Localization and Processing of the Amyloid- β Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes ». In : *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 55.4, p. 1549-1570 (cf. p. 54, 80).
- DELACOURTE, A., P. E. SAUTIÈRE, A. WATTEZ et al. (jan. 1995). « Biochemical characterization of Tau proteins during cerebral aging of the lemurian primate *Microcebus murinus* ». In : *Comptes rendus de l'Academie des sciences. Serie III, Sciences de la vie* 318.1, p. 85-89 (cf. p. 70).
- DENG, Y., Z. WANG, R. WANG et al. (2013). « Amyloid- β protein (A β) Glu11 is the major β -secretase site of β -site amyloid- β precursor protein-cleaving enzyme 1 (BACE1), and shifting the cleavage site to A β Asp1 contributes to Alzheimer pathogenesis ». In : *European Journal of Neuroscience* 37.12, p. 1962-1969 (cf. p. 46).
- DEYTS, C., M. CLUTTER, S. HERRERA et al. (2019). « Loss of presenilin function is associated with a selective gain of APP function ». In : *eLife* 5 () (cf. p. 236, 241, 271).
- DINKINS, M. B., S. DASGUPTA, G. WANG, G. ZHU et E. BIEBERICH (août 2014). « Exosome reduction in vivo is associated with lower amyloid plaque load in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease ». In : *Neurobiology of Aging* 35.8, p. 1792-1800 (cf. p. 199, 259).
- DINKINS, M. B., J. ENASKO, C. HERNANDEZ et al. (2016). « Neutral Sphingomyelinase-2 Deficiency Ameliorates Alzheimer's Disease Pathology and Improves Cognition in the 5XFAD Mouse ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 36.33, p. 8653-8667 (cf. p. 199).

- DONOVIEL, D. B., A. K. HADJANTONAKIS, M. IKEDA et al. (1^{er} nov. 1999). « Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects ». In : *Genes & Development* 13.21, p. 2801-2810 (cf. p. 50, 248, 276).
- DOODY, R. S., R. RAMAN, M. FARLOW et al. (25 juil. 2013). « A Phase 3 Trial of Semagacestat for Treatment of Alzheimer's Disease ». In : *New England Journal of Medicine* 369.4, p. 341-350 (cf. p. 277).
- DOODY, R. S., R. RAMAN, R. A. SPERLING et al. (10 juin 2015). « Peripheral and central effects of γ -secretase inhibition by semagacestat in Alzheimer's disease ». In : *Alzheimer's Research & Therapy* 7.1 (cf. p. 247).
- DRIES, D. R. et G. YU (avr. 2008). « Assembly, maturation, and trafficking of the gamma-secretase complex in Alzheimer's disease ». In : *Current Alzheimer Research* 5.2, p. 132-146 (cf. p. 48).
- DRUMMOND, E. et T. WISNIEWSKI (juin 2017). « The use of localized proteomics to identify the drivers of Alzheimer's disease pathogenesis ». In : *Neural Regeneration Research* 12.6, p. 912-913 (cf. p. 66).
- DU, J., Y. LIANG, F. XU, B. SUN et Z. WANG (déc. 2013). « Trehalose rescues Alzheimer's disease phenotypes in APP/PS1 transgenic mice ». In : *The Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65.12, p. 1753-1756 (cf. p. 123, 170).
- DU, Y., M. C. WOOTEN, M. GEARING et M. W. WOOTEN (15 fév. 2009). « Age-associated oxidative damage to the p62 promoter : implications for Alzheimer disease ». In : *Free Radical Biology & Medicine* 46.4, p. 492-501 (cf. p. 112).
- DUMANIS, S. B., T. BURGERT, S. CAGLAYAN et al. (16 sept. 2015). « Distinct Functions for Anterograde and Retrograde Sorting of SORLA in Amyloidogenic Processes in the Brain ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 35.37, p. 12703-12713 (cf. p. 62).
- DUMONT, M., R. LALONDE, J.-F. GHERSI-EGEA, K. FUKUCHI et C. STRAZIELLE (sept. 2006). « Regional acetylcholinesterase activity and its correlation with behavioral performances in 15-month old transgenic mice expressing the human C99 fragment of APP ». In : *Journal of Neural Transmission (Vienna, Austria : 1996)* 113.9, p. 1225-1241 (cf. p. 272).
- DUNYS, J., A. VALVERDE et F. CHECLER (5 oct. 2018). « Are N- and C-terminally truncated A β species key pathological triggers in Alzheimer's disease ? » In : *Journal of Biological Chemistry* 293.40, p. 15419-15428 (cf. p. 44).
- DUYCKAERTS, C., B. DELATOUR et M.-C. POTIER (juil. 2009). « Classification and basic pathology of Alzheimer disease ». In : *Acta Neuropathologica* 118.1, p. 5-36 (cf. p. 17, 70).

- DUYCKAERTS, C. et D. DICKSON (2011). « Neuropathology of Alzheimer's Disease and its Variants ». In : *Neurodegeneration : The Molecular Pathology of Dementia and Movement Disorders*. John Wiley & Sons, Ltd, p. 62-91 (cf. p. 13).
- DYRKS, T., E. DYRKS, U. MÖNNING et al. (29 nov. 1993). « Generation of beta A4 from the amyloid protein precursor and fragments thereof ». In : *FEBS letters* 335.1, p. 89-93 (cf. p. 79, 271).
- EGGERT, S., B. MIDTHUNE, B. COTTRELL et E. H. KOO (16 oct. 2009). « Induced dimerization of the amyloid precursor protein leads to decreased amyloid-beta protein production ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 284.42, p. 28943-28952 (cf. p. 244).
- EGGERT, S., C. THOMAS, S. KINS et G. HERMEY (juil. 2018). « Trafficking in Alzheimer's Disease : Modulation of APP Transport and Processing by the Transmembrane Proteins LRP1, SorLA, SorCS1c, Sortilin, and Calsyntenin ». In : *Molecular Neurobiology* 55.7, p. 5809-5829 (cf. p. 60).
- EITAN, E., C. SUIRE, S. ZHANG et M. P. MATTSON (2016). « Impact of lysosome status on extracellular vesicle content and release ». In : *Ageing Research Reviews* 32, p. 65-74 (cf. p. 191).
- EL AYADI, A., E. S. STIEREN, J. M. BARRAL et D. BOEHNING (14 août 2012). « Ubiquilin-1 regulates amyloid precursor protein maturation and degradation by stimulating K63-linked polyubiquitination of lysine 688 ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109.33, p. 13416-13421 (cf. p. 92).
- ELDAR-FINKELMAN, H. et A. MARTINEZ (31 oct. 2011). « GSK-3 Inhibitors : Preclinical and Clinical Focus on CNS ». In : *Frontiers in Molecular Neuroscience* 4 (cf. p. 169).
- ELKIN, S. R., A. M. LAKODUK et S. L. SCHMID (mai 2016). « Endocytic Pathways and Endosomal Trafficking : A Primer ». In : *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 166.7, p. 196-204 (cf. p. 100).
- EMBURY, C. M., B. DYAVARSHETTY, Y. LU et al. (2017). « Cathepsin B Improves β -Amyloidosis and Learning and Memory in Models of Alzheimer's Disease ». In : *Journal of Neuroimmune Pharmacology : The Official Journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology* 12.2, p. 340-352 (cf. p. 120).
- ESKELINEN, E.-L. (déc. 2006). « Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy ». In : *Molecular Aspects of Medicine* 27.5, p. 495-502 (cf. p. 97).
- ESTERHÁZY, D., I. STÜTZER, H. WANG et al. (7 sept. 2011). « Bace2 is a β cell-enriched protease that regulates pancreatic β cell function and mass ». In : *Cell Metabolism* 14.3, p. 365-377 (cf. p. 47).

- EVRRARD, C., P. KIENLEN-CAMPARD, M. COEVOET et al. (2018). « Contribution of the Endosomal-Lysosomal and Proteasomal Systems in Amyloid- β Precursor Protein Derived Fragments Processing ». In : *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (cf. p. 92).
- EWERS, M., N. FRANZMEIER, M. SUÁREZ-CALVET et al. (28 août 2019). « Increased soluble TREM2 in cerebrospinal fluid is associated with reduced cognitive and clinical decline in Alzheimer's disease ». In : *Science Translational Medicine* 11.507 (cf. p. 91).
- FALKER, C., A. HARTMANN, I. GUETT et al. (avr. 2016). « Exosomal cellular prion protein drives fibrillization of amyloid beta and counteracts amyloid beta-mediated neurotoxicity ». In : *Journal of Neurochemistry* 137.1, p. 88-100 (cf. p. 199).
- FARRER, L. A., L. A. CUPPLES, J. L. HAINES et al. (22 oct. 1997). « Effects of age, sex, and ethnicity on the association between apolipoprotein E genotype and Alzheimer disease. A meta-analysis. APOE and Alzheimer Disease Meta Analysis Consortium ». In : *JAMA* 278.16, p. 1349-1356 (cf. p. 24).
- FARZAN, M., C. E. SCHNITZLER, N. VASILIEVA, D. LEUNG et H. CHOE (15 août 2000). « BACE2, a beta -secretase homolog, cleaves at the beta site and within the amyloid-beta region of the amyloid-beta precursor protein ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97.17, p. 9712-9717 (cf. p. 45, 46, 249).
- FASS, E., E. SHVETS, I. DEGANI, K. HIRSCHBERG et Z. ELAZAR (24 nov. 2006). « Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 281.47, p. 36303-36316 (cf. p. 104).
- FAURÉ, J., G. LACHENAL, M. COURT et al. (avr. 2006). « Exosomes are released by cultured cortical neurones ». In : *Molecular and Cellular Neurosciences* 31.4, p. 642-648 (cf. p. 187).
- FERNANDES, A., A. R. RIBEIRO, M. MONTEIRO et al. (déc. 2018). « Secretome from SH-SY5Y APPSwe cells trigger time-dependent CHME3 microglia activation phenotypes, ultimately leading to miR-21 exosome shuttling ». In : *Biochimie* 155, p. 67-82 (cf. p. 199).
- FERRETTI, M. T., M. F. IULITA, E. CAVEDO et al. (2018). « Sex differences in Alzheimer disease - the gateway to precision medicine ». In : *Nature Reviews. Neurology* 14.8, p. 457-469 (cf. p. 22).
- FEVRIER, B., D. VILETTE, F. ARCHER et al. (29 juin 2004). « Cells release prions in association with exosomes ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.26, p. 9683-9688 (cf. p. 194).
- FIANDACA, M. S., D. KAPOGIANNIS, M. MAPSTONE et al. (juin 2015). « Identification of preclinical Alzheimer's disease by a profile of pathogenic proteins in neurally derived blood exosomes : A case-control study ». In : *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association* 11.6, 600-607.e1 (cf. p. 196).

- FLAMMANG, B., R. PARDOSSI-PIQUARD, J. SEVALLE et al. (2012). « Evidence that the amyloid- β protein precursor intracellular domain, AICD, derives from β -secretase-generated C-terminal fragment ». In : *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 30.1, p. 145-153 (cf. p. 41, 55).
- FOLCH, J., D. PETROV, M. ETTCHETO et al. (2016). « Current Research Therapeutic Strategies for Alzheimer's Disease Treatment ». In : *Neural Plasticity* 2016, p. 8501693 (cf. p. 33).
- FONTAINE, D., A. DEUDON, J. J. LEMAIRE et al. (2013). « Symptomatic treatment of memory decline in Alzheimer's disease by deep brain stimulation : a feasibility study ». In : *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 34.1, p. 315-323 (cf. p. 33).
- FRIEDMAN, L. G., Y. H. QURESHI et W. H. YU (jan. 2015). « Promoting autophagic clearance : viable therapeutic targets in Alzheimer's disease ». In : *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 12.1, p. 94-108 (cf. p. 104, 124).
- FUKUCHI, K.-i., B. SOPHER, C. E. FURLONG et al. (14 mai 1993). « Selective neurotoxicity of COOH-terminal fragments of the β -amyloid precursor protein ». In : *Neuroscience Letters* 154.1, p. 145-148 (cf. p. 271).
- FUNDERBURK, S. F., B. K. MARCELLINO et Z. YUE (2010). « Cell "self-eating" (autophagy) mechanism in Alzheimer's disease. » In : *The Mount Sinai journal of medicine, New York* 77.1, p. 59-68 (cf. p. 117).
- GAMBLIN, T. C., F. CHEN, A. ZAMBRANO et al. (19 août 2003). « Caspase cleavage of tau : linking amyloid and neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100.17, p. 10032-10037 (cf. p. 69).
- GAMES, D., D. ADAMS, R. ALESSANDRINI et al. (9 fév. 1995). « Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein ». In : *Nature* 373.6514, p. 523-527 (cf. p. 66).
- GARCÍA-AYLLÓN, M.-S., I. LOPEZ-FONT, C. P. BOIX et al. (2017). « C-terminal fragments of the amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Alzheimer disease ». In : *Scientific Reports* 7.1, p. 2477 (cf. p. 78, 200, 274).
- GAUTHIER, S. A., R. PÉREZ-GONZÁLEZ, A. SHARMA et al. (29 août 2017). « Enhanced exosome secretion in Down syndrome brain - a protective mechanism to alleviate neuronal endosomal abnormalities ». In : *Acta Neuropathologica Communications* 5 (cf. p. 200).
- GEULA, C., C. K. WU, D. SAROFF et al. (juil. 1998). « Aging renders the brain vulnerable to amyloid beta-protein neurotoxicity ». In : *Nature Medicine* 4.7, p. 827-831 (cf. p. 69).

- GHOSAL, K., D. L. VOGT, M. LIANG et al. (27 oct. 2009). « Alzheimer's disease-like pathological features in transgenic mice expressing the APP intracellular domain ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106.43, p. 18367-18372 (cf. p. 56, 241).
- GIANNAKOPOULOS, P., F. R. HERRMANN, T. BUSSIÈRE et al. (13 mai 2003). « Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease ». In : *Neurology* 60.9, p. 1495-1500 (cf. p. 70).
- GINSBERG, S. D., M. J. ALLDRED, S. E. COUNTS et al. (15 nov. 2010). « Microarray analysis of hippocampal CA1 neurons implicates early endosomal dysfunction during Alzheimer's disease progression ». In : *Biological Psychiatry* 68.10, p. 885-893 (cf. p. 109).
- GINSBERG, S. D., E. J. MUFSON, M. J. ALLDRED et al. (oct. 2011). « Upregulation of select rab GTPases in cholinergic basal forebrain neurons in mild cognitive impairment and Alzheimer's disease ». In : *Journal of Chemical Neuroanatomy* 42.2, p. 102-110 (cf. p. 109).
- GLENNER, G. G. et C. W. WONG (16 mai 1984). « Alzheimer's disease : initial report of the purification and characterization of a novel cerebrovascular amyloid protein ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120.3, p. 885-890 (cf. p. 11).
- GOATE, A., M. C. CHARTIER-HARLIN, M. MULLAN et al. (21 fév. 1991). « Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease ». In : *Nature* 349.6311, p. 704-706 (cf. p. 19).
- GOETZL, E. J., A. BOXER, J. B. SCHWARTZ et al. (7 juil. 2015). « Altered lysosomal proteins in neural-derived plasma exosomes in preclinical Alzheimer disease ». In : *Neurology* 85.1, p. 40-47 (cf. p. 262).
- GOIRAN, T., E. DUPLAN, M. CHAMI et al. (mar. 2018). « β -Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Controls Mitochondrial Function by Modulating Phosphatase and Tensin Homolog-Induced Kinase 1 Transcription in Cells and in Alzheimer Mice Models ». In : *Biological Psychiatry* 83.5, p. 416-427 (cf. p. 56).
- GOLDGABER, D., M. I. LERMAN, W. O. MCBRIDE, U. SAFFIOTTI et D. C. GAJDUSEK (1987). « Isolation, characterization, and chromosomal localization of human brain cDNA clones coding for the precursor of the amyloid of brain in Alzheimer's disease, Down's syndrome and aging ». In : *Journal of Neural Transmission. Supplementum* 24, p. 23-28 (cf. p. 35).
- GONZÁLEZ, A. E., V. C. MUÑOZ, V. A. CAVIERES et al. (2 mar. 2017). « Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein via the MVB/lysosomal pathway ». In : *The FASEB Journal* 31.6, p. 2446-2459 (cf. p. 95).
- GOODGER, Z. V., L. RAJENDRAN, A. TRUTZEL et al. (15 oct. 2009). « Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway ». In : *Journal of Cell Science* 122 (Pt 20), p. 3703-3714 (cf. p. 55).

- GÖTZ, J., F. CHEN, J. van DORPE et R. M. NITSCH (24 août 2001). « Formation of neurofibrillary tangles in P301 tau transgenic mice induced by Abeta 42 fibrils ». In : *Science (New York, N.Y.)* 293.5534, p. 1491-1495 (cf. p. 69).
- GOURAS, G. K., J. TSAI, J. NASLUND et al. (jan. 2000). « Intraneuronal Abeta42 accumulation in human brain ». In : *The American Journal of Pathology* 156.1, p. 15-20 (cf. p. 54).
- GOUTAGNY, R., N. GU, C. CAVANAGH et al. (juin 2013). « Alterations in hippocampal network oscillations and theta-gamma coupling arise before A β overproduction in a mouse model of Alzheimer's disease ». In : *The European Journal of Neuroscience* 37.12, p. 1896-1902 (cf. p. 273).
- GOWRISHANKAR, S., P. YUAN, Y. WU et al. (14 juil. 2015). « Massive accumulation of luminal protease-deficient axonal lysosomes at Alzheimer's disease amyloid plaques ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.28, E3699-E3708 (cf. p. 12).
- GRIFFITH, J. S. (sept. 1967). « Nature of the Scrapie Agent : Self-replication and Scrapie ». In : *Nature* 215.5105, p. 1043-1044 (cf. p. 194).
- GRIGNON, Y., C. DUYCKAERTS, M. BENNECIB et J. J. HAUW (avr. 1998). « Cytoarchitectonic alterations in the supramarginal gyrus of late onset Alzheimer's disease ». In : *Acta Neuropathologica* 95.4, p. 395-406 (cf. p. 15).
- GRIMM, M. O. W., J. METT, H. S. GRIMM et T. HARTMANN (2017). « APP Function and Lipids : A Bidirectional Link ». In : *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10, p. 63 (cf. p. 59).
- GRIMM, M. O. W., T. L. ROTHHAAR et T. HARTMANN (avr. 2012). « The role of APP proteolytic processing in lipid metabolism ». In : *Experimental Brain Research* 217.3, p. 365-375 (cf. p. 59).
- GUICCIARDI, M. E., M. LEIST et G. J. GORES (12 avr. 2004). « Lysosomes in cell death ». In : *Oncogene* 23.16, p. 2881-2890 (cf. p. 115).
- GUIMAS ALMEIDA, C., F. SADAT MIRFAKHAR, C. PERDIGÃO et T. BURRINHA (juil. 2018). « Impact of late-onset Alzheimer's genetic risk factors on beta-amyloid endocytic production ». In : *Cellular and Molecular Life Sciences* 75.14, p. 2577-2589 (cf. p. 108).
- GUIX, F. X., G. T. CORBETT, D. J. CHA et al. (27 fév. 2018). « Detection of Aggregation-Competent Tau in Neuron-Derived Extracellular Vesicles ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 19.3 (cf. p. 196).
- GUO, T., W. NOBLE et D. P. HANGER (1^{er} mai 2017). « Roles of tau protein in health and disease ». In : *Acta Neuropathologica* 133.5, p. 665-704 (cf. p. 11).
- HAASS, C., C. A. LEMERE, A. CAPELL et al. (déc. 1995). « The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by β -secretase cleavage within the secretory pathway ». In : *Nature Medicine* 1.12, p. 1291-1296 (cf. p. 46).

- HAMELIN, L., J. LAGARDE, G. DOROTHÉE et al. (avr. 2016). « Early and protective microglial activation in Alzheimer's disease : a prospective study using ¹⁸F-DPA-714 PET imaging ». In : *Brain* 139.4, p. 1252-1264 (cf. p. 16).
- HAMM, V., C. HÉRAUD, J.-B. BOTT et al. (fév. 2017). « Differential contribution of APP metabolites to early cognitive deficits in a TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ». In : *Science Advances* 3.2, e1601068 (cf. p. 248, 249, 273, 275, 276).
- HANIU, M., P. DENIS, Y. YOUNG et al. (14 juil. 2000). « Characterization of Alzheimer's beta-secretase protein BACE. A pepsin family member with unusual properties ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 275.28, p. 21099-21106 (cf. p. 46).
- HARDING, C., J. HEUSER et P. STAHL (août 1983). « Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes ». In : *The Journal of Cell Biology* 97.2, p. 329-339 (cf. p. 182).
- HARDY, J. A. et G. A. HIGGINS (10 avr. 1992). « Alzheimer's disease : the amyloid cascade hypothesis ». In : *Science (New York, N.Y.)* 256.5054, p. 184-185 (cf. p. 65).
- HARDY, J. et D. ALLSOP (oct. 1991). « Amyloid deposition as the central event in the aetiology of Alzheimer's disease ». In : *Trends in Pharmacological Sciences* 12.10, p. 383-388 (cf. p. 19, 65).
- HARDY, J. et D. J. SELKOE (19 juil. 2002). « The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease : progress and problems on the road to therapeutics ». In : *Science (New York, N.Y.)* 297.5580, p. 353-356 (cf. p. 67).
- HÉBERT, S. S., K. HORRÉ, L. NICOLAÏ et al. (29 avr. 2008). « Loss of microRNA cluster miR-29a/b-1 in sporadic Alzheimer's disease correlates with increased BACE1/beta-secretase expression ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.17, p. 6415-6420 (cf. p. 77, 270, 273).
- HENEKA, M. T., M. J. CARSON, J. E. KHOURY et al. (avr. 2015). « Neuroinflammation in Alzheimer's disease ». In : *The Lancet Neurology* 14.4, p. 388-405 (cf. p. 16).
- HERREMAN, A., D. HARTMANN, W. ANNAERT et al. (12 oct. 1999). « Presenilin 2 deficiency causes a mild pulmonary phenotype and no changes in amyloid precursor protein processing but enhances the embryonic lethal phenotype of presenilin 1 deficiency ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96.21, p. 11872-11877 (cf. p. 50, 248, 276).
- HESSVIK, N. P. et A. LLORENTE (2018). « Current knowledge on exosome biogenesis and release ». In : *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75.2, p. 193-208 (cf. p. 191).
- HIGASHIDE, H., S. ISHIHARA, M. NOBUHARA, Y. IHARA et S. FUNAMOTO (mar. 2017). « Alanine substitutions in the GXXXG motif alter C99 cleavage by γ -secretase but not its dimerization ». In : *Journal of Neurochemistry* 140.6, p. 955-962 (cf. p. 244).

- HIRAKURA, Y., M. C. LIN et B. L. KAGAN (15 août 1999). « Alzheimer amyloid abeta1-42 channels : effects of solvent, pH, and Congo Red ». In : *Journal of Neuroscience Research* 57.4, p. 458-466 (cf. p. 115).
- HOEFGEN, S., I. COBURGER, D. ROESER et al. (juil. 2014). « Heparin induced dimerization of APP is primarily mediated by E1 and regulated by its acidic domain ». In : *Journal of Structural Biology* 187.1, p. 30-37 (cf. p. 39).
- HOLLER, C. J., R. L. WEBB, A. L. LAUX et al. (jan. 2012). « BACE2 expression increases in human neurodegenerative disease ». In : *The American Journal of Pathology* 180.1, p. 337-350 (cf. p. 45).
- HOLMES, C., D. BOCHE, D. WILKINSON et al. (19 juil. 2008). « Long-term effects of Abeta42 immunisation in Alzheimer's disease : follow-up of a randomised, placebo-controlled phase I trial ». In : *Lancet (London, England)* 372.9634, p. 216-223 (cf. p. 70).
- HOLMES, O., S. PATURI, W. YE, M. S. WOLFE et D. J. SELKOE (1^{er} mai 2012). « Effects of membrane lipids on the activity and processivity of purified γ -secretase ». In : *Biochemistry* 51.17, p. 3565-3575 (cf. p. 49, 245).
- HOLTZMAN, D. M., A. M. FAGAN, B. MACKEY et al. (juin 2000). « Apolipoprotein E facilitates neuritic and cerebrovascular plaque formation in an Alzheimer's disease model ». In : *Annals of Neurology* 47.6, p. 739-747 (cf. p. 66).
- HONG, L., H.-C. HUANG et Z.-F. JIANG (mar. 2014). « Relationship between amyloid-beta and the ubiquitin-proteasome system in Alzheimer's disease ». In : *Neurological Research* 36.3, p. 276-282 (cf. p. 92).
- HOWITT, J. et A. F. HILL (23 déc. 2016). « Exosomes in the Pathology of Neurodegenerative Diseases ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 291.52, p. 26589-26597 (cf. p. 195).
- HSIAO, K., P. CHAPMAN, S. NILSEN et al. (4 oct. 1996). « Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice ». In : *Science (New York, N.Y.)* 274.5284, p. 99-102 (cf. p. 66).
- HUNG, C. O. et F. J. LIVESEY (26 déc. 2018). « Altered γ -Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease ». In : *Cell Reports* 25.13, 3647-3660.e2 (cf. p. 77, 110, 115, 240, 241, 249, 270, 274, 275, 277).
- HUNT, C. E. et A. J. TURNER (avr. 2009). « Cell biology, regulation and inhibition of beta-secretase (BACE-1) ». In : *The FEBS journal* 276.7, p. 1845-1859 (cf. p. 46).
- HUSSAIN, I., D. POWELL, D. R. HOWLETT et al. (déc. 1999). « Identification of a novel aspartic protease (Asp 2) as beta-secretase ». In : *Molecular and Cellular Neurosciences* 14.6, p. 419-427 (cf. p. 45).

- IGAP et G. D. SCHELLENBERG (1^{er} juil. 2012). « International Genomics of Alzheimer's Disease Project (IGAP) genome-wide association study ». In : *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association* 8.4, P101 (cf. p. 25).
- ISRAEL, M. A., S. H. YUAN, C. BARDY et al. (25 jan. 2012). « Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells ». In : *Nature* 482.7384, p. 216-220 (cf. p. 240).
- JACK, C. R., D. A. BENNETT, K. BLENNOW et al. (2 août 2016). « A/T/N : An unbiased descriptive classification scheme for Alzheimer disease biomarkers ». In : *Neurology* 87.5, p. 539-547 (cf. p. 30).
- JACK, C. R., D. S. KNOPMAN, W. J. JAGUST et al. (jan. 2010). « Hypothetical model of dynamic biomarkers of the Alzheimer's pathological cascade ». In : *The Lancet. Neurology* 9.1, p. 119-128 (cf. p. 196).
- JACK, C. R., D. S. KNOPMAN, W. J. JAGUST et al. (fév. 2013). « Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease : an updated hypothetical model of dynamic biomarkers ». In : *The Lancet Neurology* 12.2, p. 207-216 (cf. p. 31).
- JÄGER, S., S. LEUCHTENBERGER, A. MARTIN et al. (déc. 2009). « alpha-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Abeta generation ». In : *Journal of Neurochemistry* 111.6, p. 1369-1382 (cf. p. 41, 242).
- JAHREISS, L., F. M. MENZIES et D. C. RUBINSZTEIN (avr. 2008). « The itinerary of autophagosomes : from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes ». In : *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 9.4, p. 574-587 (cf. p. 104).
- JANELIDZE, S., H. ZETTERBERG, N. MATTSSON et al. (2016). « CSF A β 42/A β 40 and A β 42/A β 38 ratios : better diagnostic markers of Alzheimer disease ». In : *Annals of Clinical and Translational Neurology* 3.3, p. 154-165 (cf. p. 29).
- JANKOWSKY, J. L., H. H. SLUNT, T. RATOVITSKI et al. (juin 2001). « Co-expression of multiple transgenes in mouse CNS : a comparison of strategies ». In : *Biomolecular Engineering* 17.6, p. 157-165 (cf. p. 66).
- JANKOWSKY, J. L. et H. ZHENG (22 déc. 2017). « Practical considerations for choosing a mouse model of Alzheimer's disease ». In : *Molecular Neurodegeneration* 12.1, p. 89 (cf. p. 66).
- JAUNMUKTANE, Z., S. MEAD, M. ELLIS et al. (10 sept. 2015). « Evidence for human transmission of amyloid- β pathology and cerebral amyloid angiopathy ». In : *Nature* 525.7568, p. 247-250 (cf. p. 201).
- JEON, I., F. CICCETTI, G. CISBANI et al. (2016). « Human-to-mouse prion-like propagation of mutant huntingtin protein ». In : *Acta Neuropathologica* 132.4, p. 577-592 (cf. p. 195).

- JI, Z.-S., K. MÜLLENDORFF, I. H. CHENG et al. (3 fév. 2006). « Reactivity of apolipoprotein E4 and amyloid beta peptide : lysosomal stability and neurodegeneration ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 281.5, p. 2683-2692 (cf. p. 116).
- JIANG, T., J.-T. YU, X.-C. ZHU et al. (mar. 2014). « Temsirolimus promotes autophagic clearance of amyloid- β and provides protective effects in cellular and animal models of Alzheimer's disease ». In : *Pharmacological Research* 81, p. 54-63 (cf. p. 122, 168, 253).
- JIANG, Y., K. A. MULLANEY, C. M. PETERHOFF et al. (26 jan. 2010). « Alzheimer's-related endosome dysfunction in Down syndrome is A β -independent but requires APP and is reversed by BACE-1 inhibition ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.4, p. 1630-1635 (cf. p. 107, 117, 241).
- JIANG, Y., A. RIGOGLIOSO, C. M. PETERHOFF et al. (mar. 2016). « Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration : role of APP-CTF ». In : *Neurobiology of Aging* 39, p. 90-98 (cf. p. 109, 249, 275).
- JIANG, Y., Y. SATO, E. IM et al. (3 juil. 2019). « Lysosomal Dysfunction in Down Syndrome Is APP-Dependent and Mediated by APP- β CTF (C99) ». In : *Journal of Neuroscience* 39.27, p. 5255-5268 (cf. p. 115, 121).
- JOHNSON, K. A., N. C. FOX, R. A. SPERLING et W. E. KLUNK (1^{er} avr. 2012). « Brain Imaging in Alzheimer Disease ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2.4, a006213-a006213 (cf. p. 31, 69).
- JOHNSTONE, R. M., M. ADAM, J. R. HAMMOND, L. ORR et C. TURBIDE (5 juil. 1987). « Vesicle formation during reticulocyte maturation. Association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes) ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 262.19, p. 9412-9420 (cf. p. 182).
- JONSSON, T., J. K. ATWAL, S. STEINBERG et al. (2 août 2012). « A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline ». In : *Nature* 488.7409, p. 96-99 (cf. p. 46, 275).
- JUCKER, M. et L. C. WALKER (sept. 2013). « Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases ». In : *Nature* 501.7465, p. 45-51 (cf. p. 14).
- KADIR, A., O. ALMKVIST, A. FORSBERG et al. (jan. 2012). « Dynamic changes in PET amyloid and FDG imaging at different stages of Alzheimer's disease ». In : *Neurobiology of Aging* 33.1, 198.e1-14 (cf. p. 30).
- KALRA, H., G. P. C. DRUMMEN et S. MATHIVANAN (6 fév. 2016). « Focus on Extracellular Vesicles : Introducing the Next Small Big Thing ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 17.2, p. 170 (cf. p. 185).

- KALRA, H., R. J. SIMPSON, H. JI et al. (2012). « Vesiclepedia : a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation ». In : *PLoS biology* 10.12, e1001450 (cf. p. 185).
- KAMETANI, F. et M. HASEGAWA (2018). « Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease ». In : *Frontiers in Neuroscience* 12 (cf. p. 71).
- KAMMESHEIDT, A., F. M. BOYCE, A. F. SPANOYANNIS et al. (15 nov. 1992). « Deposition of beta/A4 immunoreactivity and neuronal pathology in transgenic mice expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor in the brain ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89.22, p. 10857-10861 (cf. p. 79, 271).
- KANG, J., H.-G. LEMAIRE, A. UNTERBECK et al. (fév. 1987). « The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor ». In : *Nature* 325.6106, p. 733-736 (cf. p. 19, 35).
- KATSUDA, T., R. TSUCHIYA, N. KOSAKA et al. (2013). « Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells secrete functional neprilysin-bound exosomes ». In : *Scientific Reports* 3, p. 1197 (cf. p. 200).
- KAUR, G., M. PAWLIK, S. E. GANDY et al. (2017). « Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein ». In : *Molecular Psychiatry* 22.7, p. 981-989 (cf. p. 77, 115, 240, 273).
- KIDD, M. (12 jan. 1963). « Paired helical filaments in electron microscopy of Alzheimer's disease ». In : *Nature* 197, p. 192-193 (cf. p. 10).
- KIENLEN-CAMPARD, P., B. TASIAUX, J. VAN HEES et al. (21 mar. 2008). « Amyloidogenic processing but not amyloid precursor protein (APP) intracellular C-terminal domain production requires a precisely oriented APP dimer assembled by transmembrane GXXXG motifs ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 283.12, p. 7733-7744 (cf. p. 38, 243, 244).
- KILPATRICK, K., Y. ZENG, T. HANCOCK et L. SEGATORI (2015). « Genetic and chemical activation of TFEB mediates clearance of aggregated α -synuclein ». In : *PloS One* 10.3, e0120819 (cf. p. 168).
- KIM, D.-K., B. KANG, O. Y. KIM et al. (jan. 2013). « EVpedia : an integrated database of high-throughput data for systemic analyses of extracellular vesicles ». In : *Journal of Extracellular Vesicles* 2.1, p. 20384 (cf. p. 185).
- KIM, J., P. CHAKRABARTY, A. HANNA et al. (12 mai 2013). « Normal cognition in transgenic BRI2-A β mice ». In : *Molecular Neurodegeneration* 8, p. 15 (cf. p. 70).

- KIM, S., Y. SATO, P. S. MOHAN et al. (mai 2016). « Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- β CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease ». In : *Molecular Psychiatry* 21.5, p. 707-716 (cf. p. 77, 109, 110, 236, 240, 270, 274).
- KIM, J.-Y., R. T. ASH, C. CEBALLOS-DIAZ et al. (avr. 2013). « Viral transduction of the neonatal brain delivers controllable genetic mosaicism for visualising and manipulating neuronal circuits *in vivo* ». In : *European Journal of Neuroscience* 37.8, p. 1203-1220 (cf. p. 162-164).
- KOLATA, G. (6 déc. 1985). « Down syndrome–Alzheimer's linked ». In : *Science (New York, N.Y.)* 230.4730, p. 1152-1153 (cf. p. 63, 69).
- KOPAN, R. et M. X. G. ILAGAN (2004). « Gamma-secretase : proteasome of the membrane ? » In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 5.6, p. 499-504 (cf. p. 236).
- KOZLOWSKI, M., A. SPANOYANNIS, S. MANLY, S. FIDEL et R. NEVE (1^{er} mai 1992). « The neurotoxic carboxy-terminal fragment of the Alzheimer amyloid precursor binds specifically to a neuronal cell surface molecule : pH dependence of the neurotoxicity and the binding ». In : *The Journal of Neuroscience* 12.5, p. 1679-1687 (cf. p. 271).
- KUMAR, S. et J. WALTER (août 2011). « Phosphorylation of amyloid beta (A β) peptides - a trigger for formation of toxic aggregates in Alzheimer's disease ». In : *Aging* 3.8, p. 803-812 (cf. p. 42).
- KUMMER, M. P., M. HERMES, A. DELEKARTE et al. (8 sept. 2011). « Nitration of tyrosine 10 critically enhances amyloid β aggregation and plaque formation ». In : *Neuron* 71.5, p. 833-844 (cf. p. 42).
- KWART, D., A. GREGG, C. SCHECKEL et al. (23 oct. 2019). « A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP β -CTFs, Not A β ». In : *Neuron* 104.2, 256-270.e5 (cf. p. 77, 109, 236, 237, 240-242, 249, 270, 274, 275, 277).
- LA JOIE, R., A. PERROTIN, V. de LA SAYETTE et al. (2013). « Hippocampal subfield volumetry in mild cognitive impairment, Alzheimer's disease and semantic dementia ». In : *NeuroImage. Clinical* 3, p. 155-162 (cf. p. 30).
- LA ROSA, L. R., L. PERRONE, M. S. NIELSEN et al. (7 avr. 2015). « Y682G Mutation of Amyloid Precursor Protein Promotes Endo-Lysosomal Dysfunction by Disrupting APP–SorLA Interaction ». In : *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9 (cf. p. 62).
- LAFERLA, F. M., K. N. GREEN et S. ODDO (juil. 2007). « Intracellular amyloid-beta in Alzheimer's disease ». In : *Nature Reviews. Neuroscience* 8.7, p. 499-509 (cf. p. 54).

- LAIRD, F. M., H. CAI, A. V. SAVONENKO et al. (14 déc. 2005). « BACE1, a major determinant of selective vulnerability of the brain to amyloid-beta amyloidogenesis, is essential for cognitive, emotional, and synaptic functions ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 25.50, p. 11693-11709 (cf. p. 45, 249, 275).
- LALONDE, R., M. DUMONT, M. STAUFENBIEL, C. STURCHLER-PIERRAT et C. STRAZIELLE (22 nov. 2002). « Spatial learning, exploration, anxiety, and motor coordination in female APP23 transgenic mice with the Swedish mutation ». In : *Brain Research* 956.1, p. 36-44 (cf. p. 9).
- LAMBERT, J.-C., D. MANN, F. RICHARD et al. (juil. 2005). « Is there a relation between APOE expression and brain amyloid load in Alzheimer's disease ? » In : *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 76.7, p. 928-933 (cf. p. 24).
- LAMBERT, M. P., P. T. VELASCO, L. CHANG et al. (jan. 2007). « Monoclonal antibodies that target pathological assemblies of A β ». In : *Journal of Neurochemistry* 100.1, p. 23-35 (cf. p. 76).
- LAULAGNIER, K., C. JAVALET, F. J. HEMMING et al. (2018). « Amyloid precursor protein products concentrate in a subset of exosomes specifically endocytosed by neurons ». In : *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 75.4, p. 757-773 (cf. p. 197, 238).
- LAURITZEN, I., R. PARDOSSI-PIQUARD, C. BAUER et al. (14 nov. 2012). « The -Secretase-Derived C-Terminal Fragment of APP, C99, But Not A , Is a Key Contributor to Early Intra-neuronal Lesions in Triple-Transgenic Mouse Hippocampus ». In : *Journal of Neuroscience* 32.46, p. 16243-16255 (cf. p. 74, 269, 272, 273).
- LAURITZEN, I., A. BÉCOT, A. BOURGEOIS et al. (2019). « Targeting γ -secretase triggers the selective enrichment of oligomeric APP-CTFs in brain extracellular vesicles from Alzheimer cell and mouse models ». In : *Translational Neurodegeneration* 8, p. 35 (cf. p. 203, 237, 241, 242, 245, 272, 276).
- LAURITZEN, I., R. PARDOSSI-PIQUARD, A. BOURGEOIS et al. (août 2016). « Intra-neuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology ». In : *Acta Neuropathologica* 132.2, p. 257-276 (cf. p. 71, 74-76, 110, 115, 116, 162, 169, 203, 228, 240, 248, 269, 272, 276).
- LAWRENCE, R. E. et R. ZONCU (2019). « The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control ». In : *Nature Cell Biology* 21.2, p. 133-142 (cf. p. 97).
- LEE, J.-H., M. K. MCBRAYER, D. M. WOLFE et al. (1^{er} sept. 2015). « Presenilin 1 Maintains Lysosomal Ca(2+) Homeostasis via TRPML1 by Regulating vATPase-Mediated Lysosome Acidification ». In : *Cell Reports* 12.9, p. 1430-1444 (cf. p. 115, 121).

- LEE, J.-H., W. H. YU, A. KUMAR et al. (25 juin 2010). « Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations ». In : *Cell* 141.7, p. 1146-1158 (cf. p. 114).
- LEE, K.-W., J.-Y. IM, J.-S. SONG et al. (avr. 2006). « Progressive neuronal loss and behavioral impairments of transgenic C57BL/6 inbred mice expressing the carboxy terminus of amyloid precursor protein ». In : *Neurobiology of Disease* 22.1, p. 10-24 (cf. p. 240, 272).
- LEMMON, M. A. et J. SCHLESSINGER (25 juin 2010). « Cell signaling by receptor-tyrosine kinases ». In : *Cell* 141.7, p. 1117-1134 (cf. p. 38).
- LEPLUS, A., I. LAURITZEN, C. MELON et al. (jan. 2019). « Chronic fornix deep brain stimulation in a transgenic Alzheimer's rat model reduces amyloid burden, inflammation, and neuronal loss ». In : *Brain Structure and Function* 224.1, p. 363-372 (cf. p. 33).
- LEVY, E. (23 mar. 2017). « Exosomes in the Diseased Brain : First Insights from In vivo Studies ». In : *Frontiers in Neuroscience* 11 (cf. p. 191).
- LEWIS, J., D. W. DICKSON, W. L. LIN et al. (24 août 2001). « Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP ». In : *Science (New York, N.Y.)* 293.5534, p. 1487-1491 (cf. p. 69).
- LI, J.-G., J. CHIU et D. PRATICÒ (7 fév. 2019). « Full recovery of the Alzheimer's disease phenotype by gain of function of Vacuolar Protein Sorting 35 ». In : *Molecular psychiatry* (cf. p. 111).
- LI, N., K. LIU, Y. QIU et al. (11 mar. 2016). « Effect of Presenilin Mutations on APP Cleavage ; Insights into the Pathogenesis of FAD ». In : *Frontiers in Aging Neuroscience* 8 (cf. p. 236).
- LI, S., M. JIN, L. LIU et al. (8 nov. 2018). « Decoding the synaptic dysfunction of bioactive human AD brain soluble A β to inspire novel therapeutic avenues for Alzheimer's disease ». In : *Acta Neuropathologica Communications* 6.1, p. 121 (cf. p. 69).
- LIM, C. Z. J., Y. ZHANG, Y. CHEN et al. (2019). « Subtyping of circulating exosome-bound amyloid β reflects brain plaque deposition ». In : *Nature Communications* 10.1, p. 1144 (cf. p. 239, 260).
- LIN, Y.-T., J. SEO, F. GAO et al. (2018). « APOE4 Causes Widespread Molecular and Cellular Alterations Associated with Alzheimer's Disease Phenotypes in Human iPSC-Derived Brain Cell Types ». In : *Neuron* 98.6, 1141-1154.e7 (cf. p. 250).
- LIU, J. et L. LI (2019). « Targeting Autophagy for the Treatment of Alzheimer's Disease : Challenges and Opportunities ». In : *Frontiers in Molecular Neuroscience* 12 (cf. p. 116).
- LOPES, K. O., D. L. SPARKS et W. J. STREIT (2008). « Microglial dystrophy in the aged and Alzheimer's disease brain is associated with ferritin immunoreactivity. » In : *Glia* 56.10, p. 1048-1060 (cf. p. 17).

- LOZANO, A. M., L. FOSDICK, M. M. CHAKRAVARTY et al. (2016). « A Phase II Study of Fornix Deep Brain Stimulation in Mild Alzheimer's Disease ». In : *Journal of Alzheimer's Disease* 54.2, p. 777-787 (cf. p. 33).
- LUZIO, J. P., P. R. PRYOR et N. A. BRIGHT (août 2007). « Lysosomes : fusion and function ». In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8.8, p. 622-632 (cf. p. 97).
- MADRONAL, N., J. M. DELGADO-GARCÍA, A. FERNÁNDEZ-GUIZÁN et al. (18 mar. 2016). « Rapid erasure of hippocampal memory following inhibition of dentate gyrus granule cells ». In : *Nature Communications* 7.1, p. 1-10 (cf. p. 8).
- MAHLEY, R. W. et Y. HUANG (2006). « Apolipoprotein (apo) E4 and Alzheimer's disease : unique conformational and biophysical properties of apoE4 can modulate neuropathology ». In : *Acta Neurologica Scandinavica. Supplementum* 185, p. 8-14 (cf. p. 116).
- MAJUMDER, S., A. RICHARDSON, R. STRONG et S. ODDO (2011). « Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits ». In : *PloS One* 6.9, e25416 (cf. p. 122).
- MALONEY, J. A., T. BAINBRIDGE, A. GUSTAFSON et al. (7 nov. 2014). « Molecular Mechanisms of Alzheimer Disease Protection by the A673T Allele of Amyloid Precursor Protein ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 289.45, p. 30990-31000 (cf. p. 275).
- MARTINI-STOICA, H., A. L. COLE, D. B. SWARTZLANDER et al. (3 sept. 2018). « TFEB enhances astroglial uptake of extracellular tau species and reduces tau spreading ». In : *The Journal of Experimental Medicine* 215.9, p. 2355-2377 (cf. p. 131, 132).
- MARTINI-STOICA, H., Y. XU, A. BALLABIO et H. ZHENG (avr. 2016). « The Autophagy–Lysosomal Pathway in Neurodegeneration : A TFEB Perspective ». In : *Trends in Neurosciences* 39.4, p. 221-234 (cf. p. 129).
- MARUYAMA, K., K. TERAKADO, M. USAMI et K. YOSHIKAWA (11 oct. 1990). « Formation of amyloid-like fibrils in COS cells overexpressing part of the Alzheimer amyloid protein precursor ». In : *Nature* 347.6293, p. 566-569 (cf. p. 79, 271).
- MASTERS, C. L., G. SIMMS, N. A. WEINMAN et al. (juin 1985). « Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 82.12, p. 4245-4249 (cf. p. 11).
- MATHIVANAN, S. et R. J. SIMPSON (nov. 2009). « ExoCarta : A compendium of exosomal proteins and RNA ». In : *Proteomics* 9.21, p. 4997-5000 (cf. p. 185).
- MATSUMOTO, Y., S. WATANABE, Y.-H. SUH et T. YAMAMOTO (2002). « Effects of intrahippocampal CT105, a carboxyl terminal fragment of β -amyloid precursor protein, alone/with inflammatory cytokines on working memory in rats ». In : *Journal of Neurochemistry* 82.2, p. 234-239 (cf. p. 272).

- MC CONLOGUE, L., M. BUTTINI, J. P. ANDERSON et al. (9 juil. 2007). « Partial Reduction of BACE1 Has Dramatic Effects on Alzheimer Plaque and Synaptic Pathology in APP Transgenic Mice ». In : *Journal of Biological Chemistry* 282.36, p. 26326-26334 (cf. p. 275).
- MCDERMOTT, J. R. et A. M. GIBSON (jan. 1997). « Degradation of Alzheimer's beta-amyloid protein by human and rat brain peptidases : involvement of insulin-degrading enzyme ». In : *Neurochemical Research* 22.1, p. 49-56 (cf. p. 96).
- MCPHIE, D. L., T. GOLDE, C. B. ECKMAN et al. (16 déc. 2001). « beta-Secretase cleavage of the amyloid precursor protein mediates neuronal apoptosis caused by familial Alzheimer's disease mutations ». In : *Brain Research. Molecular Brain Research* 97.1, p. 103-113 (cf. p. 271, 275, 276).
- MECKLER, X. et F. CHECLER (10 juin 2016). « Presenilin 1 and Presenilin 2 Target γ -Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments ». In : *Journal of Biological Chemistry* 291.24, p. 12821-12837 (cf. p. 49).
- MECOZZI, V. J., D. E. BERMAN, S. SIMOES et al. (juin 2014). « Pharmacological chaperones stabilize retromer to limit APP processing ». In : *Nature Chemical Biology* 10.6, p. 443-449 (cf. p. 123).
- MEDINA, D. L., A. FRALDI, V. BOUCHE et al. (13 sept. 2011). « Transcriptional activation of lysosomal exocytosis promotes cellular clearance ». In : *Developmental Cell* 21.3, p. 421-430 (cf. p. 132).
- MELDOLESI, J. (2018). « Exosomes and Ectosomes in Intercellular Communication ». In : *Current biology : CB* 28.8, R435-R444 (cf. p. 185, 191).
- MIRANDA, A. M. et G. D. PAOLO (5 avr. 2018). « Endolysosomal dysfunction and exosome secretion : implications for neurodegenerative disorders ». In : *Cell Stress* 2.5, p. 115-118 (cf. p. 201, 202, 226, 261).
- MITANI, Y., J. YARIMIZU, K. SAITA et al. (8 fév. 2012). « Differential effects between γ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32.6, p. 2037-2050 (cf. p. 248, 276).
- MIZUSHIMA, N. et M. KOMATSU (11 nov. 2011). « Autophagy : renovation of cells and tissues ». In : *Cell* 147.4, p. 728-741 (cf. p. 100).
- MIZUSHIMA, N., T. NODA, T. YOSHIMORI et al. (sept. 1998). « A protein conjugation system essential for autophagy ». In : *Nature* 395.6700, p. 395-398 (cf. p. 100).

- MONDRAGÓN-RODRÍGUEZ, S., N. GU, F. MANSEAU et S. WILLIAMS (8 mai 2018). « Alzheimer's Transgenic Model Is Characterized by Very Early Brain Network Alterations and β -CTF Fragment Accumulation : Reversal by β -Secretase Inhibition ». In : *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (cf. p. 77, 249, 273, 275).
- MORALES-GARCIA, J. A., R. LUNA-MEDINA, S. ALONSO-GIL et al. (21 nov. 2012). « Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes adult hippocampal neurogenesis in vitro and in vivo ». In : *ACS chemical neuroscience* 3.11, p. 963-971 (cf. p. 169).
- MOREL, E., Z. CHAMOUN, Z. M. LASIECKA et al. (2013). « PI3P regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system ». In : *Nature communications* 4, p. 2250 (cf. p. 92).
- MOREL, M., C. HÉRAUD, C. NICAISE, V. SUAIN et J.-P. BRION (jan. 2012). « Levels of kinesin light chain and dynein intermediate chain are reduced in the frontal cortex in Alzheimer's disease : implications for axoplasmic transport ». In : *Acta Neuropathologica* 123.1, p. 71-84 (cf. p. 113).
- MORRIS, R. G. (mai 1981). « Spatial localization does not require the presence of local cues ». In : *Learning and Motivation* 12.2, p. 239-260 (cf. p. 8).
- MORVAN, J., R. KÖCHL, R. WATSON et al. (1^{er} juil. 2009). « In vitro reconstitution of fusion between immature autophagosomes and endosomes ». In : *Autophagy* 5.5, p. 676-689 (cf. p. 103).
- MUCKE, L., E. MASLIAH, G. Q. YU et al. (1^{er} juin 2000). « High-level neuronal expression of abeta 1-42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice : synaptotoxicity without plaque formation ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20.11, p. 4050-4058 (cf. p. 66).
- MUELLER-STEINER, S., Y. ZHOU, H. ARAI et al. (21 sept. 2006). « Antiamyloidogenic and neuroprotective functions of cathepsin B : implications for Alzheimer's disease ». In : *Neuron* 51.6, p. 703-714 (cf. p. 120).
- MUKHIN, V. N., K. I. PAVLOV et V. M. KLIMENKO (juin 2017). « Mechanisms of Neuron Loss in Alzheimer's Disease ». In : *Neuroscience and Behavioral Physiology* 47.5, p. 508-516 (cf. p. 15).
- MUNTER, L.-M., P. VOIGT, A. HARMEIER et al. (21 mar. 2007). « GxxxG motifs within the amyloid precursor protein transmembrane sequence are critical for the etiology of Abeta42 ». In : *The EMBO journal* 26.6, p. 1702-1712 (cf. p. 38, 244).
- NAGY, J. I., W. LI, E. L. HERTZBERG et C. A. MAROTTA (22 avr. 1996). « Elevated connexin43 immunoreactivity at sites of amyloid plaques in Alzheimer's disease ». In : *Brain Research* 717.1, p. 173-178 (cf. p. 70).

- NALBANTOGLU, J., G. TIRADO-SANTIAGO, A. LAHSAÏNI et al. (29 mai 1997). « Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein ». In : *Nature* 387.6632, p. 500-505 (cf. p. 79, 271).
- NALIVAeva, N. N. et A. J. TURNER (sept. 2019). « Targeting amyloid clearance in Alzheimer's disease as a therapeutic strategy ». In : *British Journal of Pharmacology* 176.18, p. 3447-3463 (cf. p. 90).
- NAPOLITANO, G. et A. BALLABIO (2016). « TFEB at a glance ». In : *Journal of Cell Science* 129.13, p. 2475-2481 (cf. p. 128, 131, 252).
- NASLAVSKY, N. et S. CAPLAN (1^{er} juil. 2018). « The enigmatic endosome – sorting the ins and outs of endocytic trafficking ». In : *Journal of Cell Science* 131.13, jcs216499 (cf. p. 100).
- NEVE, R. L., F. M. BOYCE, D. L. MCPHIE, J. GREENAN et M. L. OSTER-GRANITE (avr. 1996). « Transgenic mice expressing APP-C100 in the brain ». In : *Neurobiology of Aging* 17.2, p. 191-203 (cf. p. 79).
- NEVE, R. L., A. KAMMESHEIDT et C. F. HOHMANN (15 avr. 1992). « Brain transplants of cells expressing the carboxyl-terminal fragment of the Alzheimer amyloid protein precursor cause specific neuropathology in vivo. » In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89.8, p. 3448-3452 (cf. p. 271).
- NGANDU, T., J. LEHTISALO, A. SOLOMON et al. (6 juin 2015). « A 2 year multidomain intervention of diet, exercise, cognitive training, and vascular risk monitoring versus control to prevent cognitive decline in at-risk elderly people (FINGER) : a randomised controlled trial ». In : *Lancet (London, England)* 385.9984, p. 2255-2263 (cf. p. 23).
- NHAN, H. S., K. CHIANG et E. H. KOO (jan. 2015). « The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments : friends and foes ». In : *Acta Neuropathologica* 129.1, p. 1-19 (cf. p. 242).
- NIELSEN, M. S., C. GUSTAFSEN, P. MADSEN et al. (oct. 2007). « Sorting by the Cytoplasmic Domain of the Amyloid Precursor Protein Binding Receptor SorLA ». In : *Molecular and Cellular Biology* 27.19, p. 6842-6851 (cf. p. 62).
- NIXON, R. A. (juil. 2017). « Amyloid precursor protein and endosomal–lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease : inseparable partners in a multifactorial disease ». In : *The FASEB Journal* 31.7, p. 2729-2743 (cf. p. 96, 111, 116, 168).
- (1^{er} déc. 2007). « Autophagy, amyloidogenesis and Alzheimer disease ». In : *Journal of Cell Science* 120.23, p. 4081-4091 (cf. p. 17).
- NIXON, R. A., J. WEGIEL, A. KUMAR et al. (fév. 2005). « Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease : an immuno-electron microscopy study ». In : *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 64.2, p. 113-122 (cf. p. 111, 115, 270).

- NIXON, R. A. et D.-S. YANG (1^{er} oct. 2012). « Autophagy and neuronal cell death in neurological disorders ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 4.10 (cf. p. 102, 104).
- NORDBERG, A., J. O. RINNE, A. KADIR et B. LÅNGSTRÖM (fév. 2010). « The use of PET in Alzheimer disease ». In : *Nature Reviews. Neurology* 6.2, p. 78-87 (cf. p. 30).
- NUNAN, J., M. S. SHEARMAN, F. CHECLER et al. (oct. 2001). « The C-terminal fragment of the Alzheimer's disease amyloid protein precursor is degraded by a proteasome-dependent mechanism distinct from gamma-secretase ». In : *European Journal of Biochemistry* 268.20, p. 5329-5336 (cf. p. 92).
- NUNAN, J., N. A. WILLIAMSON, A. F. HILL et al. (1^{er} nov. 2003). « Proteasome-mediated degradation of the C-terminus of the Alzheimer's disease beta-amyloid protein precursor : effect of C-terminal truncation on production of beta-amyloid protein ». In : *Journal of Neuroscience Research* 74.3, p. 378-385 (cf. p. 92).
- NURIEL, T., K. Y. PENG, A. ASHOK et al. (2017). « The Endosomal-Lysosomal Pathway Is Dysregulated by APOE4 Expression in Vivo ». In : *Frontiers in Neuroscience* 11, p. 702 (cf. p. 24, 69, 250).
- NUSSBAUM, J. M., S. SCHILLING, H. CYNIS et al. (2 mai 2012). « Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid- β ». In : *Nature* 485.7400, p. 651-655 (cf. p. 42).
- O'BRIEN, R. J. et P. C. WONG (2011). « Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease ». In : *Annual review of neuroscience* 34, p. 185-204 (cf. p. 36).
- OAKLEY, H., S. L. COLE, S. LOGAN et al. (4 oct. 2006). « Intraneuronal beta-amyloid aggregates, neurodegeneration, and neuron loss in transgenic mice with five familial Alzheimer's disease mutations : potential factors in amyloid plaque formation ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26.40, p. 10129-10140 (cf. p. 66).
- ODDO, S., A. CACCAMO, J. D. SHEPHERD et al. (p. d.). « Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles : Intracellular Ab and Synaptic Dysfunction ». In : (), p. 13 (cf. p. 54, 65, 69, 74).
- ORR, M. E. et S. ODDO (2013). « Autophagic/lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease ». In : *Alzheimer's Research & Therapy* 5.5, p. 53 (cf. p. 116).
- OSTER-GRANITE, M. L., D. L. MCPHIE, J. GREENAN et R. L. NEVE (1^{er} nov. 1996). « Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16.21, p. 6732-6741 (cf. p. 79, 240, 271).

- OSTROWSKI, M., N. B. CARMO, S. KRUMEICH et al. (jan. 2010). « Rab27a and Rab27b control different steps of the exosome secretion pathway ». In : *Nature Cell Biology* 12.1, 19-30, sup pp 1-13 (cf. p. 184).
- PALMIERI, M., R. PAL, H. R. NELVAGAL et al. (avr. 2017). « mTORC1-independent TFEB activation via Akt inhibition promotes cellular clearance in neurodegenerative storage diseases ». In : *Nature Communications* 8.1, p. 14338 (cf. p. 169, 253).
- PANTELOPULOS, G. A., J. E. STRAUB, D. THIRUMALAI et Y. SUGITA (11 fév. 2018). *Structure of APP-C99₁₋₉₉ and Implications for Role of Extra-Membrane Domains in Function and Oligomerization*. preprint. Biophysics (cf. p. 245).
- PANZA, F., M. LOZUPONE, V. SOLFRIZZI et al. (nov. 2018). « BACE inhibitors in clinical development for the treatment of Alzheimer's disease ». In : *Expert Review of Neurotherapeutics* 18.11, p. 847-857 (cf. p. 250).
- PARCON, P. A., M. BALASUBRAMANIAM, S. AYYADEVARA et al. (2018). « Apolipoprotein E4 inhibits autophagy gene products through direct, specific binding to CLEAR motifs ». In : *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association* 14.2, p. 230-242 (cf. p. 130).
- PARDOSSI-PIQUARD, R., I. LAURITZEN, C. BAUER et al. (2016). « Influence of Genetic Background on Apathy-Like Behavior in Triple Transgenic AD Mice ». In : *Current Alzheimer Research* 13.8, p. 942-949 (cf. p. 9, 168, 269, 272, 273).
- PARDOSSI-PIQUARD, R. et F. CHECLER (jan. 2012). « The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD : AICD production, regulation, degradation and function ». In : *Journal of Neurochemistry* 120, p. 109-124 (cf. p. 56, 241).
- PARDOSSI-PIQUARD, R., A. PETIT, T. KAWARAI et al. (19 mai 2005). « Presenilin-dependent transcriptional control of the Abeta-degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP ». In : *Neuron* 46.4, p. 541-554 (cf. p. 56).
- PARK, S. S., H.-J. JUNG, Y.-J. KIM et al. (déc. 2012). « Asp664 cleavage of amyloid precursor protein induces tau phosphorylation by decreasing protein phosphatase 2A activity ». In : *Journal of Neurochemistry* 123.5, p. 856-865 (cf. p. 69).
- PARR, C., R. CARZANIGA, S. M. GENTLEMAN et al. (nov. 2012). « Glycogen synthase kinase 3 inhibition promotes lysosomal biogenesis and autophagic degradation of the amyloid- β precursor protein ». In : *Molecular and Cellular Biology* 32.21, p. 4410-4418 (cf. p. 169).
- PASCOAL, T. A., S. MATHOTAARACHCHI, S. MOHADES et al. (2017). « Amyloid- β and hyperphosphorylated tau synergy drives metabolic decline in preclinical Alzheimer's disease ». In : *Molecular Psychiatry* 22.2, p. 306-311 (cf. p. 71).

- PASSER, B., L. PELLEGRINI, C. RUSSO et al. (nov. 2000). « Generation of an apoptotic intracellular peptide by gamma-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid beta protein precursor ». In : *Journal of Alzheimer's disease : JAD* 2.3, p. 289-301 (cf. p. 55).
- PATEL, G. K., M. A. KHAN, H. ZUBAIR et al. (29 mar. 2019). « Comparative analysis of exosome isolation methods using culture supernatant for optimum yield, purity and downstream applications ». In : *Scientific Reports* 9.1, p. 1-10 (cf. p. 278).
- PENG, W., G. MINAKAKI, M. NGUYEN et D. KRAINIC (juil. 2019). « Preserving Lysosomal Function in the Aging Brain : Insights from Neurodegeneration ». In : *Neurotherapeutics : The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 16.3, p. 611-634 (cf. p. 124, 255).
- PERA, M., D. ALCOLEA, R. SÁNCHEZ-VALLE et al. (fév. 2013). « Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease ». In : *Acta Neuropathologica* 125.2, p. 201-213 (cf. p. 77, 110, 236, 270, 273).
- PEREZ-GONZALEZ, R., S. A. GAUTHIER, A. KUMAR et E. LEVY (14 déc. 2012). « The Exosome Secretory Pathway Transports Amyloid Precursor Protein Carboxyl-terminal Fragments from the Cell into the Brain Extracellular Space ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 287.51, p. 43108-43115 (cf. p. 188, 198, 238, 239).
- PÉREZ-GONZÁLEZ, R., S. A. GAUTHIER, A. KUMAR et al. (2017). « A Method for Isolation of Extracellular Vesicles and Characterization of Exosomes from Brain Extracellular Space ». In : *Exosomes and Microvesicles*. Sous la dir. d'A. F. HILL. T. 1545. New York, NY : Springer New York, p. 139-151 (cf. p. 188).
- PÉREZ-GONZÁLEZ, R., S. A. GAUTHIER, A. SHARMA et al. (1^{er} août 2019). « A pleiotropic role for exosomes loaded with the amyloid β precursor protein carboxyl-terminal fragments in the brain of Down syndrome patients ». In : *Neurobiology of Aging* 84, p. 26-32 (cf. p. 200, 239).
- PICKFORD, F., E. MASLIAH, M. BRITSCHGI et al. (2 juin 2008). « The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid β accumulation in mice ». In : *The Journal of Clinical Investigation* 118.6, p. 2190-2199 (cf. p. 112, 123).
- PIMPLIKAR, S. W., R. A. NIXON, N. K. ROBAKIS, J. SHEN et L.-H. TSAI (10 nov. 2010). « Amyloid-independent mechanisms in Alzheimer's disease pathogenesis ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 30.45, p. 14946-14954 (cf. p. 117, 248).
- PINES, A. (2 sept. 2016). « Alzheimer's disease, menopause and the impact of the estrogenic environment ». In : *Climacteric* 19.5, p. 430-432 (cf. p. 22).

- PISITKUN, T., R.-F. SHEN et M. A. KNEPPER (7 sept. 2004). « Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101.36, p. 13368-13373 (cf. p. 198).
- POLANCO, J. C., C. LI, N. DURISIC, R. SULLIVAN et J. GÖTZ (déc. 2018). « Exosomes taken up by neurons hijack the endosomal pathway to spread to interconnected neurons ». In : *Acta Neuropathologica Communications* 6.1, p. 10 (cf. p. 196).
- POLANCO, J. C., B. J. SCICLUNA, A. F. HILL et J. GÖTZ (10 juin 2016). « Extracellular Vesicles Isolated from the Brains of rTg4510 Mice Seed Tau Protein Aggregation in a Threshold-dependent Manner ». In : *Journal of Biological Chemistry* 291.24, p. 12445-12466 (cf. p. 196).
- POLITO, V. A., H. LI, H. MARTINI-STOICA et al. (1^{er} sept. 2014). « Selective clearance of aberrant tau proteins and rescue of neurotoxicity by transcription factor EB ». In : *EMBO Molecular Medicine* 6.9, p. 1142-1160 (cf. p. 132, 252).
- PONCE, F. A., W. F. ASAAD, K. D. FOOTE et al. (juil. 2016). « Bilateral deep brain stimulation of the fornix for Alzheimer's disease : surgical safety in the ADvance trial ». In : *Journal of neurosurgery* 125.1, p. 75-84 (cf. p. 33).
- POUSINHA, P. A., X. MOUSKA, D. BIANCHI et al. (oct. 2019). « The Amyloid Precursor Protein C-Terminal Domain Alters CA1 Neuron Firing, Modifying Hippocampus Oscillations and Impairing Spatial Memory Encoding ». In : *Cell Reports* 29.2, 317-331.e5 (cf. p. 242).
- POUSINHA, P. A., X. MOUSKA, E. F. RAYMOND et al. (2017). « Physiological and pathophysiological control of synaptic GluN2B-NMDA receptors by the C-terminal domain of amyloid precursor protein ». In : *eLife* 6 (cf. p. 242).
- PRASHER, V. P., M. J. FARRER, A. M. KESSLING et al. (mar. 1998). « Molecular mapping of Alzheimer-type dementia in Down's syndrome ». In : *Annals of Neurology* 43.3, p. 380-383 (cf. p. 19).
- PRUSINER, S. B. (9 avr. 1982). « Novel proteinaceous infectious particles cause scrapie ». In : *Science* 216.4542, p. 136-144 (cf. p. 194).
- PUERTOLLANO, R., S. M. FERGUSON, J. BRUGAROLAS et A. BALLABIO (2018). « The complex relationship between TFEB transcription factor phosphorylation and subcellular localization ». In : *The EMBO journal* 37.11 (cf. p. 126).
- PULINA, M., M. HOPKINS, V. HAROUTUNIAN, P. GREENGARD et V. BUSTOS (22 jan. 2019). « C99, not beta-amyloid, is associated with selective death of vulnerable neurons in Alzheimer's disease. » In : *bioRxiv*, p. 527572 (cf. p. 78, 110, 236, 274).

- RABER, J., S. F. AKANA, S. BHATNAGAR et al. (1^{er} mar. 2000). « Hypothalamic-pituitary-adrenal dysfunction in Apoe(-/-) mice : possible role in behavioral and metabolic alterations ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 20.5, p. 2064-2071 (cf. p. 66).
- RAJENDRAN, L. et W. ANNAERT (juin 2012). « Membrane trafficking pathways in Alzheimer's disease ». In : *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 13.6, p. 759-770 (cf. p. 111, 238).
- RAJENDRAN, L., J. BALI, M. M. BARR et al. (12 nov. 2014). « Emerging Roles of Extracellular Vesicles in the Nervous System ». In : *The Journal of Neuroscience* 34.46, p. 15482-15489 (cf. p. 190).
- RAJENDRAN, L., M. HONSHO, T. R. ZAHN et al. (25 juil. 2006). « Alzheimer's disease beta-amyloid peptides are released in association with exosomes ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103.30, p. 11172-11177 (cf. p. 45, 197, 198, 200, 239).
- RAPOSO, G., H. W. NIJMAN, W. STOOORVOGEL et al. (1^{er} mar. 1996). « B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. » In : *Journal of Experimental Medicine* 183.3, p. 1161-1172 (cf. p. 190).
- REDDY, K., C. L. CUSACK, I. C. NNAH et al. (8 mar. 2016). « Dysregulation of Nutrient Sensing and CLEARance in Presenilin Deficiency ». In : *Cell Reports* 14.9, p. 2166-2179 (cf. p. 130).
- REISS, A. B., H. A. ARAIN, M. M. STECKER, N. M. SIEGART et L. J. KASSELMAN (2018). « Amyloid toxicity in Alzheimer's disease ». In : *Reviews in the Neurosciences* 29.6, p. 613-627 (cf. p. 54).
- REITZ, C. et R. MAYEUX (15 avr. 2014). « Alzheimer disease : Epidemiology, Diagnostic Criteria, Risk Factors and Biomarkers ». In : *Biochemical pharmacology* 88.4, p. 640-651 (cf. p. 23).
- RENNA, M., M. JIMENEZ-SANCHEZ, S. SARKAR et D. C. RUBINSZTEIN (9 avr. 2010). « Chemical inducers of autophagy that enhance the clearance of mutant proteins in neurodegenerative diseases ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 285.15, p. 11061-11067 (cf. p. 124).
- RICHTER, L., L.-M. MUNTER, J. NESS et al. (17 août 2010). « Amyloid beta 42 peptide (Abeta42)-lowering compounds directly bind to Abeta and interfere with amyloid precursor protein (APP) transmembrane dimerization ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107.33, p. 14597-14602 (cf. p. 248).
- RIES, M. et M. SASTRE (2016). « Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells ». In : *Frontiers in Aging Neuroscience* 8 (cf. p. 90, 91).

- ROBERT, P. H., C. BERR, M. VOLTEAU et al. (déc. 2006). « Apathy in patients with mild cognitive impairment and the risk of developing dementia of Alzheimer's disease : a one-year follow-up study ». In : *Clinical Neurology and Neurosurgery* 108.8, p. 733-736 (cf. p. 9).
- ROCCHI, A., S. YAMAMOTO, T. TING et al. (août 2017). « A Becn1 mutation mediates hyperactive autophagic sequestration of amyloid oligomers and improved cognition in Alzheimer's disease ». In : *PLoS genetics* 13.8, e1006962 (cf. p. 123).
- ROCHIN, L., I. HURBAIN, L. SERNEELS et al. (25 juin 2013). « BACE2 processes PMEL to form the melanosome amyloid matrix in pigment cells ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110.26, p. 10658-10663 (cf. p. 47).
- ROSSJOHN, J., R. CAPPAL, S. C. FEIL et al. (avr. 1999). « Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein ». In : *Nature Structural Biology* 6.4, p. 327-331 (cf. p. 36).
- ROTERMUND, C., G. MACHETANZ et J. C. FITZGERALD (2018). « The Therapeutic Potential of Metformin in Neurodegenerative Diseases ». In : *Frontiers in Endocrinology* 9 (cf. p. 123).
- ROVELET-LECRUX, A., D. HANNEQUIN, G. RAUX et al. (jan. 2006). « APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy ». In : *Nature Genetics* 38.1, p. 24-26 (cf. p. 19, 69).
- RUBINSZTEIN, D. C., C. F. BENTO et V. DERETIC (29 juin 2015). « Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases ». In : *The Journal of Experimental Medicine* 212.7, p. 979-990 (cf. p. 255).
- RUTTEN, B. P. F., O. WIRTHS, W. D. J. VAN DE BERG et al. (mar. 2003). « No alterations of hippocampal neuronal number and synaptic bouton number in a transgenic mouse model expressing the beta-cleaved C-terminal APP fragment ». In : *Neurobiology of Disease* 12.2, p. 110-120 (cf. p. 272).
- SAINT-AUBERT, L., L. LEMOINE, K. CHIOTIS et al. (2017). « Tau PET imaging : present and future directions ». In : *Molecular Neurodegeneration* 12.1, p. 19 (cf. p. 30).
- SAITO, T., Y. MATSUBA, N. MIHIRA et al. (1^{er} juil. 2012). « APP knock-in mouse : A novel and more relevant model mouse for Alzheimer's disease ». In : *Alzheimer's & Dementia : The Journal of the Alzheimer's Association* 8.4, P203-P204 (cf. p. 66).
- SAITO, T., Y. MATSUBA, N. MIHIRA et al. (mai 2014). « Single App knock-in mouse models of Alzheimer's disease ». In : *Nature Neuroscience* 17.5, p. 661-663 (cf. p. 66, 77, 273).
- SALEEM, S. et R. R. KANNAN (2018). « Zebrafish : an emerging real-time model system to study Alzheimer's disease and neurospecific drug discovery ». In : *Cell Death Discovery* 4, p. 45 (cf. p. 259).

- SAMAN, S., W. KIM, M. RAYA et al. (3 fév. 2012). « Exosome-associated tau is secreted in tauopathy models and is selectively phosphorylated in cerebrospinal fluid in early Alzheimer disease ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 287.6, p. 3842-3849 (cf. p. 196).
- SANNERUD, R., C. ESSELENS, P. EJSMONT et al. (juin 2016). « Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool ». In : *Cell* 166.1, p. 193-208 (cf. p. 49, 50, 53, 237).
- SARDAR SINHA, M., A. ANSELL-SCHULTZ, L. CIVITELLI et al. (2018). « Alzheimer's disease pathology propagation by exosomes containing toxic amyloid-beta oligomers ». In : *Acta Neuropathologica* 136.1, p. 41-56 (cf. p. 200, 239).
- SARDIELLO, M. (mai 2016). « Transcription factor EB : from master coordinator of lysosomal pathways to candidate therapeutic target in degenerative storage diseases : TFEB, a master coordinator of lysosomal pathways ». In : *Annals of the New York Academy of Sciences* 1371.1, p. 3-14 (cf. p. 127, 251).
- SARDIELLO, M., M. PALMIERI, A. di RONZA et al. (24 juil. 2009). « A gene network regulating lysosomal biogenesis and function ». In : *Science (New York, N.Y.)* 325.5939, p. 473-477 (cf. p. 125, 127).
- SARKAR, S., R. A. FLOTO, Z. BERGER et al. (26 sept. 2005). « Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase ». In : *The Journal of Cell Biology* 170.7, p. 1101-1111 (cf. p. 124).
- SASAGURI, H., P. NILSSON, S. HASHIMOTO et al. (1^{er} sept. 2017). « APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies ». In : *The EMBO Journal* 36.17, p. 2473-2487 (cf. p. 66).
- SATO, M., T. KAWARABAYASHI, M. SHOJI et al. (oct. 1997). « Neurodegeneration and gliosis in transgenic mice overexpressing a carboxy-terminal fragment of Alzheimer amyloid-beta protein precursor ». In : *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 8.5, p. 296-307 (cf. p. 271).
- SCHAEFFER, V., I. LAVENIR, S. OZCELIK et al. (juil. 2012). « Stimulation of autophagy reduces neurodegeneration in a mouse model of human tauopathy ». In : *Brain* 135.7, p. 2169-2177 (cf. p. 169).
- SCHERZER, C. R., K. OFFE, M. GEARING et al. (août 2004). « Loss of apolipoprotein E receptor LR11 in Alzheimer disease ». In : *Archives of Neurology* 61.8, p. 1200-1205 (cf. p. 27).
- SCHON, E. A. et E. AREA-GOMEZ (juil. 2013). « Mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease ». In : *Molecular and Cellular Neurosciences* 55, p. 26-36 (cf. p. 80).

- SCHROETER, E. H., J. A. KISSLINGER et R. KOPAN (28 mai 1998). « Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain ». In : *Nature* 393.6683, p. 382-386 (cf. p. 50).
- SEKINE-AIZAWA, Y., E. HAMA, K. WATANABE et al. (mar. 2001). « Matrix metalloproteinase (MMP) system in brain : identification and characterization of brain-specific MMP highly expressed in cerebellum ». In : *The European Journal of Neuroscience* 13.5, p. 935-948 (cf. p. 43).
- SELKOE, D. J. (12 déc. 1991). « Alzheimer's disease. In the beginning.. » In : *Nature* 354.6353, p. 432-433 (cf. p. 65).
- SELKOE, D. J. et J. HARDY (juin 2016). « The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years ». In : *EMBO Molecular Medicine* 8.6, p. 595-608 (cf. p. 67, 68).
- SETTEMBRE, C. et A. BALLABIO (5 mai 2014). « Lysosomal adaptation : how the lysosome responds to external cues ». In : *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6.6 (cf. p. 97).
- SHAKED, G. M., M. P. KUMMER, D. C. LU et al. (juin 2006). « Abeta induces cell death by direct interaction with its cognate extracellular domain on APP (APP 597-624) ». In : *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 20.8, p. 1254-1256 (cf. p. 244).
- SHANKAR, G. M., B. L. BLOODGOOD, M. TOWNSEND et al. (14 mar. 2007). « Natural Oligomers of the Alzheimer Amyloid- β Protein Induce Reversible Synapse Loss by Modulating an NMDA-Type Glutamate Receptor-Dependent Signaling Pathway ». In : *The Journal of Neuroscience* 27.11, p. 2866-2875 (cf. p. 15).
- SHARPLES, R. A., L. J. VELLA, R. M. NISBET et al. (mai 2008). « Inhibition of γ -secretase causes increased secretion of amyloid precursor protein C-terminal fragments in association with exosomes ». In : *The FASEB Journal* 22.5, p. 1469-1478 (cf. p. 197, 238).
- SHIMODA, M. et R. KHOKHA (nov. 2017). « Metalloproteinases in extracellular vesicles ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1864.11, p. 1989-2000 (cf. p. 198).
- SIKANYIKA, N. L., H. C. PARKINGTON, A. I. SMITH et S. KURUPPU (juin 2019). « Powering Amyloid Beta Degrading Enzymes : A Possible Therapy for Alzheimer's Disease ». In : *Neurochemical Research* 44.6, p. 1289-1296 (cf. p. 90).
- SIMPSON, R. J., H. KALRA et S. MATHIVANAN (2012). « ExoCarta as a resource for exosomal research ». In : *Journal of Extracellular Vesicles* 1 (cf. p. 185).
- SINHA, S., J. P. ANDERSON, R. BARBOUR et al. (2 déc. 1999). « Purification and cloning of amyloid precursor protein beta-secretase from human brain ». In : *Nature* 402.6761, p. 537-540 (cf. p. 45, 259).
- SMALL, S. A. et K. DUFF (26 nov. 2008). « Linking Abeta and tau in late-onset Alzheimer's disease : a dual pathway hypothesis ». In : *Neuron* 60.4, p. 534-542 (cf. p. 71).

- SMALL, S. A., K. KENT, A. PIERCE et al. (déc. 2005). « Model-guided microarray implicates the retromer complex in Alzheimer's disease ». In : *Annals of Neurology* 58.6, p. 909-919 (cf. p. 111).
- SON, S. M., E. S. JUNG, H. J. SHIN, J. BYUN et I. MOOK-JUNG (mai 2012). « A β -induced formation of autophagosomes is mediated by RAGE-CaMKK β -AMPK signaling ». In : *Neurobiology of Aging* 33.5, 1006.e11-23 (cf. p. 112).
- SONG, D. K., M. H. WON, J. S. JUNG et al. (août 1998). « Behavioral and neuropathologic changes induced by central injection of carboxyl-terminal fragment of beta-amyloid precursor protein in mice ». In : *Journal of Neurochemistry* 71.2, p. 875-878 (cf. p. 272).
- SONG, Y., E. J. HUSTEDT, S. BRANDON et C. R. SANDERS (30 juil. 2013). « Competition Between Homodimerization and Cholesterol Binding to the C99 Domain of the Amyloid Precursor Protein ». In : *Biochemistry* 52.30, p. 5051-5064 (cf. p. 244).
- SONG, Y., A. K. KENWORTHY et C. R. SANDERS (jan. 2014). « Cholesterol as a co-solvent and a ligand for membrane proteins ». In : *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 23.1, p. 1-22 (cf. p. 168).
- SORIA, F. N., O. PAMPLIEGA, M. BOURDENX et al. (31 jan. 2017). « Exosomes, an Unmasked Culprit in Neurodegenerative Diseases ». In : *Frontiers in Neuroscience* 11 (cf. p. 185, 195).
- SOUTHAN, C. et J. HANCOCK (2013). « A tale of two drug targets : the evolutionary history of BACE1 and BACE2 ». In : *Frontiers in Genetics* 4 (cf. p. 45).
- SPASIC, D. et W. ANNAERT (15 fév. 2008). « Building γ -secretase – the bits and pieces ». In : *Journal of Cell Science* 121.4, p. 413-420 (cf. p. 48).
- STANGL, M. et D. SCHNEIDER (1^{er} sept. 2015). « Functional competition within a membrane : Lipid recognition vs. transmembrane helix oligomerization ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes. Lipid-protein interactions* 1848.9, p. 1886-1896 (cf. p. 244).
- STEINER, H., A. FUKUMORI, S. TAGAMI et M. OKOCHI (28 oct. 2018). « Making the final cut : pathogenic amyloid- β peptide generation by γ -secretase ». In : *Cell Stress* 2.11, p. 292-310 (cf. p. 51).
- STRITTMATTER, W. J., A. M. SAUNDERS, D. SCHMECHEL et al. (1^{er} mar. 1993). « Apolipoprotein E : high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90.5, p. 1977-1981 (cf. p. 24).
- STUENDL, A., M. KUNADT, N. KRUSE et al. (fév. 2016). « Induction of α -synuclein aggregate formation by CSF exosomes from patients with Parkinson's disease and dementia with Lewy bodies ». In : *Brain : A Journal of Neurology* 139 (Pt 2), p. 481-494 (cf. p. 195).

- STURCHLER-PIERRAT, C., D. ABRAMOWSKI, M. DUKE et al. (25 nov. 1997). « Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94.24, p. 13287-13292 (cf. p. 66).
- SUN, B., Y. ZHOU, B. HALABISKY et al. (23 oct. 2008). « Cystatin C-cathepsin B axis regulates amyloid beta levels and associated neuronal deficits in an animal model of Alzheimer's disease ». In : *Neuron* 60.2, p. 247-257 (cf. p. 120).
- SUN, L., R. ZHOU, G. YANG et Y. SHI (24 jan. 2017). « Analysis of 138 pathogenic mutations in presenilin-1 on the in vitro production of A β 42 and A β 40 peptides by γ -secretase ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114.4, E476-E485 (cf. p. 21, 270).
- SUZUKI, K. et R. D. TERRY (5 mai 1967). « Fine structural localization of acid phosphatase in senile plaques in Alzheimer's presenile dementia ». In : *Acta Neuropathologica* 8.3, p. 276-284 (cf. p. 107).
- SZARUGA, M., B. MUNTEANU, S. LISMONT et al. (27 juil. 2017). « Alzheimer's-Causing Mutations Shift A β Length by Destabilizing γ -Secretase-A β n Interactions ». In : *Cell* 170.3, 443-456.e14 (cf. p. 50).
- TAKAMI, M., Y. NAGASHIMA, Y. SANO et al. (14 oct. 2009). « gamma-Secretase : successive tripeptide and tetrapeptide release from the transmembrane domain of beta-carboxyl terminal fragment ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 29.41, p. 13042-13052 (cf. p. 49).
- TAKASUGI, N., R. ARAYA, Y. KAMIKUBO et al. (7 août 2018). « TMEM30A is a candidate interacting partner for the β -carboxyl-terminal fragment of amyloid- β precursor protein in endosomes ». In : *PLoS ONE* 13.8 (cf. p. 109).
- TAMAYEV, R., S. MATSUDA, O. ARANCIO et L. D'ADAMIO (mar. 2012). « β - but not γ -secretase proteolysis of APP causes synaptic and memory deficits in a mouse model of dementia ». In : *EMBO molecular medicine* 4.3, p. 171-179 (cf. p. 249, 275, 276).
- TANZI, R., J. GUSELLA, P. WATKINS et al. (20 fév. 1987). « Amyloid beta protein gene : cDNA, mRNA distribution, and genetic linkage near the Alzheimer locus ». In : *Science* 235.4791, p. 880-884 (cf. p. 35).
- TELLER, J. K., C. RUSSO, L. M. DEBUSK et al. (jan. 1996). « Presence of soluble amyloid beta-peptide precedes amyloid plaque formation in Down's syndrome ». In : *Nature Medicine* 2.1, p. 93-95 (cf. p. 110).
- THAL, D. R., U. RÜB, M. ORANTES et H. BRAAK (25 juin 2002). « Phases of A beta-deposition in the human brain and its relevance for the development of AD ». In : *Neurology* 58.12, p. 1791-1800 (cf. p. 13, 70).

- THARP, W. G. et I. N. SARKAR (30 avr. 2013). « Origins of amyloid- β ». In : *BMC genomics* 14, p. 290 (cf. p. 35).
- THÉRY, C., M. OSTROWSKI et E. SEGURA (août 2009). « Membrane vesicles as conveyors of immune responses ». In : *Nature Reviews Immunology* 9.8, p. 581-593 (cf. p. 185).
- THÉRY, C., K. W. WITWER, E. AIKAWA et al. (1^{er} déc. 2018). « Minimal information for studies of extracellular vesicles 2018 (MISEV2018) : a position statement of the International Society for Extracellular Vesicles and update of the MISEV2014 guidelines ». In : *Journal of Extracellular Vesicles* 7.1, p. 1535750 (cf. p. 187).
- THINAKARAN, G. et E. H. KOO (31 oct. 2008). « Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 283.44, p. 29615-29619 (cf. p. 56).
- TIAN, Y., V. BUSTOS, M. FLAJOLET et P. GREENGARD (juin 2011). « A small-molecule enhancer of autophagy decreases levels of A β and APP-CTF via Atg5-dependent autophagy pathway ». In : *The FASEB Journal* 25.6, p. 1934-1942 (cf. p. 104, 122, 169, 237).
- TIAN, Y., J. C. CHANG, E. Y. FAN, M. FLAJOLET et P. GREENGARD (15 oct. 2013). « Adaptor complex AP2/PICALM, through interaction with LC3, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.42, p. 17071-17076 (cf. p. 103).
- TIEN, N. T., I. KARACA, I. Y. TAMBOLI et J. WALTER (13 mai 2016). « Trehalose Alters Subcellular Trafficking and the Metabolism of the Alzheimer-associated Amyloid Precursor Protein ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 291.20, p. 10528-10540 (cf. p. 170).
- TOWNSEND, M., Y. QU, A. GRAY et al. (avr. 2010). « Oral treatment with a gamma-secretase inhibitor improves long-term potentiation in a mouse model of Alzheimer's disease ». In : *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 333.1, p. 110-119 (cf. p. 247).
- TRAMBAUER, J., A. FUKUMORI, B. KRETNER et H. STEINER (2017). « Analyzing Amyloid- β Peptide Modulation Profiles and Binding Sites of γ -Secretase Modulators ». In : *Methods in Enzymology* 584, p. 157-183 (cf. p. 248).
- TSUKADA, M. et Y. OHSUMI (25 oct. 1993). « Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae* ». In : *FEBS letters* 333.1, p. 169-174 (cf. p. 100).
- TURK, B., D. TURK et V. TURK (7 mar. 2000). « Lysosomal cysteine proteases : more than scavengers ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 1477.1, p. 98-111 (cf. p. 96).
- UDDIN, M. S., A. A. MAMUN, Z. K. LABU et al. (juin 2019). « Autophagic dysfunction in Alzheimer's disease : Cellular and molecular mechanistic approaches to halt Alzheimer's pathogenesis ». In : *Journal of Cellular Physiology* 234.6, p. 8094-8112 (cf. p. 124).

- UDDIN, M. S., A. STACHOWIAK, A. A. MAMUN et al. (30 jan. 2018). « Autophagy and Alzheimer's Disease : From Molecular Mechanisms to Therapeutic Implications ». In : *Frontiers in Aging Neuroscience* 10 (cf. p. 104, 124).
- VALADI, H., K. EKSTRÖM, A. BOSSIOS et al. (juin 2007). « Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells ». In : *Nature Cell Biology* 9.6, p. 654-659 (cf. p. 190).
- VAN ACKER, Z. P., M. BRETOUT et W. ANNAERT (3 juin 2019). « Endo-lysosomal dysregulations and late-onset Alzheimer's disease : impact of genetic risk factors ». In : *Molecular Neurodegeneration* 14.1, p. 20 (cf. p. 25, 26, 61, 238, 268).
- Van NIEL, G., G. D'ANGELO et G. RAPOSO (2018). « Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles ». In : *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 19.4, p. 213-228 (cf. p. 185, 186).
- VASSAR, R., B. D. BENNETT, S. BABU-KHAN et al. (22 oct. 1999). « Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE ». In : *Science (New York, N.Y.)* 286.5440, p. 735-741 (cf. p. 45).
- VELLA, L. J., R. A. SHARPLES, V. A. LAWSON et al. (avr. 2007). « Packaging of prions into exosomes is associated with a novel pathway of PrP processing ». In : *The Journal of Pathology* 211.5, p. 582-590 (cf. p. 194).
- VELLA, L. J., A. F. HILL et L. CHENG (6 fév. 2016). « Focus on Extracellular Vesicles : Exosomes and Their Role in Protein Trafficking and Biomarker Potential in Alzheimer's and Parkinson's Disease ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 17.2 (cf. p. 187).
- VELLA, L. J., R. A. SHARPLES, R. M. NISBET, R. CAPPALAI et A. F. HILL (mar. 2008). « The role of exosomes in the processing of proteins associated with neurodegenerative diseases ». In : *European biophysics journal : EBJ* 37.3, p. 323-332 (cf. p. 194).
- VERWEIJ, F. J., C. REVENU, G. ARRAS et al. (2019). « Live Tracking of Inter-organ Communication by Endogenous Exosomes In Vivo ». In : *Developmental Cell* 48.4, 573-589.e4 (cf. p. 259).
- VILLEMAGNE, V. L. (2 jan. 2018). « Selective Tau Imaging : Der Stand der Dinge ». In : *Journal of Nuclear Medicine* 59.2, p. 175-176 (cf. p. 30).
- VILLEMAGNE, V. L. et N. OKAMURA (fév. 2016). « Tau imaging in the study of ageing, Alzheimer's disease, and other neurodegenerative conditions ». In : *Current Opinion in Neurobiology* 36, p. 43-51 (cf. p. 30).
- VINGTDEUX, V., M. HAMDANE, A. LOYENS et al. (22 juin 2007). « Alkalinizing Drugs Induce Accumulation of Amyloid Precursor Protein By-products in Luminal Vesicles of Multivesicular Bodies ». In : *Journal of Biological Chemistry* 282.25, p. 18197-18205 (cf. p. 104, 197, 237, 238).

- VISWANATHAN, K., D. J. HOOVER, J. HWANG et al. (8 nov. 2012). « Nonpeptidic lysosomal modulators derived from z-phe-ala-diazomethylketone for treating protein accumulation diseases ». In : *ACS medicinal chemistry letters* 3.11, p. 920-924 (cf. p. 121).
- Von ROTZ, R. C., B. M. KOHLI, J. BOSSET et al. (1^{er} sept. 2004). « The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor ». In : *Journal of Cell Science* 117 (Pt 19), p. 4435-4448 (cf. p. 56).
- WANG, C., B. SUN, Y. ZHOU, A. GRUBB et L. GAN (16 nov. 2012). « Cathepsin B Degrades Amyloid- β in Mice Expressing Wild-type Human Amyloid Precursor Protein ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 287.47, p. 39834-39841 (cf. p. 120).
- WANG, H., S. HUANG, K. YAN et al. (2016a). « Tideglusib, a chemical inhibitor of GSK3 β , attenuates hypoxic-ischemic brain injury in neonatal mice ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 1860.10, p. 2076-2085 (cf. p. 169, 253).
- WANG, H., N. SANG, C. ZHANG et al. (12 mai 2015). « Cathepsin L Mediates the Degradation of Novel APP C-Terminal Fragments ». In : *Biochemistry* 54.18, p. 2806-2816 (cf. p. 104, 237).
- WANG, H. et A. J. SAUNDERS (août 2014). « The role of ubiquitin-proteasome in the metabolism of amyloid precursor protein (APP) : implications for novel therapeutic strategies for Alzheimer's disease ». In : *Discovery Medicine* 18.97, p. 41-50 (cf. p. 92).
- WANG, H., R. WANG, S. XU et M. K. LAKSHMANA (2016b). « Transcription Factor EB Is Selectively Reduced in the Nuclear Fractions of Alzheimer's and Amyotrophic Lateral Sclerosis Brains ». In : *Neuroscience Journal* 2016, p. 1-8 (cf. p. 130, 132, 252).
- WANG, Y., V. BALAJI, S. KANIYAPPAN et al. (13 jan. 2017). « The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes ». In : *Molecular Neurodegeneration* 12.1, p. 5 (cf. p. 196).
- WATANABE, T., Y. HIKICHI, A. WILLUWEIT, Y. SHINTANI et T. HORIGUCHI (7 mar. 2012). « FBL2 regulates amyloid precursor protein (APP) metabolism by promoting ubiquitination-dependent APP degradation and inhibition of APP endocytosis ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32.10, p. 3352-3365 (cf. p. 92).
- WILLEM, M., S. TAHIROVIC, M. A. BUSCHE et al. (15 oct. 2015). « η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus ». In : *Nature* 526.7573, p. 443-447 (cf. p. 42, 43, 250).
- WILLIAMSON, R. L., K. LAULAGNIER, A. M. MIRANDA et al. (2017). « Disruption of amyloid precursor protein ubiquitination selectively increases amyloid β (A β) 40 levels via presenilin 2-mediated cleavage ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 292.48, p. 19873-19889 (cf. p. 198).

- WILLNOW, T. E. et O. M. ANDERSEN (1^{er} juil. 2013). « Sorting receptor SORLA – a trafficking path to avoid Alzheimer disease ». In : *Journal of Cell Science* 126.13, p. 2751-2760 (cf. p. 62, 64).
- WINKLER, E., A. JULIUS, H. STEINER et D. LANGOSCH (13 oct. 2015). « Homodimerization Protects the Amyloid Precursor Protein C99 Fragment from Cleavage by γ -Secretase ». In : *Biochemistry* 54.40, p. 6149-6152 (cf. p. 49, 244, 245).
- WOLF, D., D. QUON, Y. WANG et B. CORDELL (1^{er} juil. 1990). « Identification and characterization of C-terminal fragments of the beta-amyloid precursor produced in cell culture. » In : *The EMBO Journal* 9.7, p. 2079-2084 (cf. p. 79, 271).
- WOLFE, M. S. (9 juil. 2019). « Structure and Function of the γ -Secretase Complex ». In : *Biochemistry* 58.27, p. 2953-2966 (cf. p. 49).
- WU, L. et L. ZHAO (mar. 2016). « ApoE2 and Alzheimer's disease : time to take a closer look ». In : *Neural Regeneration Research* 11.3, p. 412-413 (cf. p. 24).
- XIAO, Q., P. YAN, X. MA et al. (16 juil. 2014). « Enhancing Astrocytic Lysosome Biogenesis Facilitates A Clearance and Attenuates Amyloid Plaque Pathogenesis ». In : *Journal of Neuroscience* 34.29, p. 9607-9620 (cf. p. 132, 133, 162).
- XIAO, Q., P. YAN, X. MA et al. (2 sept. 2015). « Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing A Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis ». In : *Journal of Neuroscience* 35.35, p. 12137-12151 (cf. p. 133).
- XIN, S.-H., L. TAN, X. CAO, J.-T. YU et L. TAN (1^{er} oct. 2018). « Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease : from Mechanisms to Therapy ». In : *Neurotoxicity Research* 34.3, p. 733-748 (cf. p. 90, 93).
- XU, H. et D. REN (2015). « Lysosomal physiology ». In : *Annual Review of Physiology* 77, p. 57-80 (cf. p. 97).
- XU, W., A. M. WEISSMILLER, J. A. WHITE et al. (2016). « Amyloid precursor protein-mediated endocytic pathway disruption induces axonal dysfunction and neurodegeneration ». In : *The Journal of Clinical Investigation* 126.5, p. 1815-1833 (cf. p. 109, 240).
- YAN, R., M. J. BIENKOWSKI, M. E. SHUCK et al. (2 déc. 1999). « Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity ». In : *Nature* 402.6761, p. 533-537 (cf. p. 45).
- YAN, R. (19 avr. 2017). « Physiological Functions of the β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2 ». In : *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (cf. p. 46).
- YAN, R. et R. VASSAR (mar. 2014). « Targeting the β secretase BACE1 for Alzheimer's disease therapy ». In : *Lancet neurology* 13.3, p. 319-329 (cf. p. 250).

- YAN, Y., T.-H. XU, K. G. HARIKUMAR et al. (8 août 2017). « Dimerization of the transmembrane domain of amyloid precursor protein is determined by residues around the gamma-secretase cleavage sites ». In : *Journal of Biological Chemistry*, jbc.M117.789669 (cf. p. 46, 243).
- YANG, L.-B., K. LINDHOLM, R. YAN et al. (jan. 2003). « Elevated β -secretase expression and enzymatic activity detected in sporadic Alzheimer disease ». In : *Nature Medicine* 9.1, p. 3-4 (cf. p. 46).
- YANG, D.-S., P. STAVRIDES, A. KUMAR et al. (5 jan. 2017). « Cyclodextrin has conflicting actions on autophagy flux *in vivo* in brains of normal and Alzheimer model mice ». In : *Human Molecular Genetics*, p. ddx001 (cf. p. 170, 253).
- YANG, D.-S., P. STAVRIDES, P. S. MOHAN et al. (jan. 2011). « Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies and memory deficits ». In : *Brain : A Journal of Neurology* 134 (Pt 1), p. 258-277 (cf. p. 120).
- YANG, D.-S., P. STAVRIDES, M. SAITO et al. (déc. 2014). « Defective macroautophagic turnover of brain lipids in the TgCRND8 Alzheimer mouse model : prevention by correcting lysosomal proteolytic deficits ». In : *Brain : A Journal of Neurology* 137 (Pt 12), p. 3300-3318 (cf. p. 120).
- YANKNER, B. A., L. R. DAWES, S. FISHER et al. (28 juil. 1989). « Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease ». In : *Science (New York, N.Y.)* 245.4916, p. 417-420 (cf. p. 79, 271).
- YAO, J., D. HO, N. Y. CALINGASAN et al. (17 déc. 2012). « Neuroprotection by cyclodextrin in cell and mouse models of Alzheimer disease ». In : *The Journal of Experimental Medicine* 209.13, p. 2501-2513 (cf. p. 121, 168, 253).
- YONEMURA, Y., E. FUTAI, S. YAGISHITA, C. KAETHER et S. ISHIURA (2016). « Specific combinations of presenilins and Aph1s affect the substrate specificity and activity of γ -secretase ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 478.4, p. 1751-1757 (cf. p. 47).
- YOSHIKAI, S.-i., H. SASAKI, K. DOH-URA, H. FURUYA et Y. SAKAKI (15 mar. 1990). « Genomic organization of the human amyloid beta-protein precursor gene ». In : *Gene* 87.2, p. 257-263 (cf. p. 35).
- YOUNG, J. E., L. K. FONG, H. FRANKOWSKI et al. (2018). « Stabilizing the Retromer Complex in a Human Stem Cell Model of Alzheimer's Disease Reduces TAU Phosphorylation Independently of Amyloid Precursor Protein ». In : *Stem Cell Reports* 10.3, p. 1046-1058 (cf. p. 123).
- YUYAMA, K., H. SUN, S. SAKAI et al. (29 août 2014). « Decreased amyloid- β pathologies by intracerebral loading of glycosphingolipid-enriched exosomes in Alzheimer model mice ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 289.35, p. 24488-24498 (cf. p. 200).

- YUYAMA, K., H. SUN, S. USUKI et al. (2 jan. 2015). « A potential function for neuronal exosomes : sequestering intracerebral amyloid- β peptide ». In : *FEBS letters* 589.1, p. 84-88 (cf. p. 200).
- ZHANG, Q.-Y., M.-S. TAN, J.-T. YU et L. TAN (2016). « The Role of Retromer in Alzheimer's Disease ». In : *Molecular Neurobiology* 53.6, p. 4201-4209 (cf. p. 99).
- ZHANG, X., K. GARBETT, K. VEERARAGHAVALU et al. (20 juin 2012). « A role for presenilins in autophagy revisited : normal acidification of lysosomes in cells lacking PSEN1 and PSEN2 ». In : *The Journal of Neuroscience : The Official Journal of the Society for Neuroscience* 32.25, p. 8633-8648 (cf. p. 115).
- ZHENG, H., M. JIANG, M. E. TRUMBAUER et al. (19 mai 1995). « beta-Amyloid precursor protein-deficient mice show reactive gliosis and decreased locomotor activity ». In : *Cell* 81.4, p. 525-531 (cf. p. 38).
- ZHENG, T., J. PU, Y. CHEN et al. (juil. 2017). « Exosomes Secreted from HEK293-APP Swe/Ind Cells Impair the Hippocampal Neurogenesis ». In : *Neurotoxicity Research* 32.1, p. 82-93 (cf. p. 199).
- ZHOU, Y., X. WANG, M. SONG et al. (déc. 2019). « A secreted microRNA disrupts autophagy in distinct tissues of *Caenorhabditis elegans* upon ageing ». In : *Nature Communications* 10.1, p. 4827 (cf. p. 255).
- ZHU, L., M. ZHONG, G. A. ELDER et al. (22 sept. 2015). « Phospholipid dysregulation contributes to ApoE4-associated cognitive deficits in Alzheimer's disease pathogenesis ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112.38, p. 11965-11970 (cf. p. 24).

Colophon

Cette thèse a été rédigée avec \LaTeX 2 ϵ , en utilisant le style *Clean Thesis*, développé par Ricardo Langner¹.

1. <http://cleanthesis.der-ric.de/>

