



HAL
open science

Influences biochimiques, anatomiques et cognitives de la troncation exopeptidasique N-terminale du peptide $A\beta$

Audrey Valverde

► **To cite this version:**

Audrey Valverde. Influences biochimiques, anatomiques et cognitives de la troncation exopeptidasique N-terminale du peptide $A\beta$. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2020. Français. NNT : 2020COAZ6034 . tel-03284876

HAL Id: tel-03284876

<https://theses.hal.science/tel-03284876>

Submitted on 13 Jul 2021

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

Influences biochimiques, anatomiques et cognitives de
la troncation exopeptidasique N-terminale du peptide
 $A\beta$

Audrey VALVERDE

IPMC –Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire- Equipe Frédéric CHECLER,
Biologie cellulaire et moléculaire du vieillissement cérébral normal et pathologique

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

Dirigée par : Frédéric Checler et Luc Buée

Co-encadrée par : Julie Dunys

Soutenue le : 10/12/2020

Devant le jury, composé de :

Dr Slavica Krantic, d'Université Paris-Sorbonne

Dr Delatour Benoit, d'Université UPMC-Paris

Pr Roques Bernard, d'Université René Descartes-Paris

Dr Rivera Santiago, d'Université Aix-Marseille




Ecole doctorale N°85 : Science de la Vie et de la Santé

Influences biochimiques, anatomiques et cognitives de la troncation exopeptidasique N-terminale du peptide $A\beta$.

Audrey Valverde

Jury :

 Président du jury : décidé lors de la présentation orale

 Rapporteur(e)s :

- Dr KRANTIC SLAVICA, CR-HC CNRS-HDR, Centre de recherche de l'hôpital Saint-Antoine-UMR-S938 INSERM-Paris
- Dr DELATOUR BENOIT, CR CNRS-HDR, Institut du Cerveau et de la Moelle épinière-UMR_S 1127/UMR 7225- Paris

 Examineurs :

- Pr ROQUES BERNARD, Pr émérite, UFR des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques à l'Université René Descartes- Paris
- Dr RIVERA SANTIAGO, DR-CNRS (équivalent HDR), Institut de NeuroPhysiopathologie (INP)- UMR 7051- Marseille

 Directeurs de thèse et invités :

- Dr CHECLER FREDERIC, DR-INSERM (équivalent HDR), Institut pharmacologie moléculaire et cellulaire (IPMC)-UMR 7275- Sophia-Antipolis (Directeur de thèse)
- Dr BUEE LUC, DR-CNRS (équivalent HDR), Centre de recherche Jean-Pierre Aubert (CRJPA), UMR-S 1172-Lille (co-directeur de thèse)
- Dr DUNYS JULIE, IGR, Institut pharmacologie moléculaire et cellulaire (IPMC)-UMR 7275- Sophia-Antipolis (Encadrante)

Résumé

Les diverses formes provenant du peptide amyloïde ($A\beta$) procurent une complexité non négligeable à la Maladie Alzheimer (MA) et demandent une meilleure compréhension de leurs rôles. Depuis peu, leur implication dans l'initiation et l'aggravation de la pathologie semble irrévocable, du fait de leur forte présence dans les cerveaux de patients. Des travaux stipulent que la perte de ces fragments, en particulier les $A\beta$ s tronqués en N-terminal, améliorent considérablement les fonctions cognitives de plusieurs modèles murins de MA. L'hypothèse de mon projet de recherche a donc été d'analyser l'implication de deux enzymes, pour l'instant peu étudiées dans ce contexte, sur la troncation du peptide $A\beta$ dans la région N-terminale. Durant ma thèse, j'ai étudié le rôle des 2 enzymes candidates à ce clivage : l'Amino-peptidase A (APA) et la Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4).

J'ai démontré l'influence des deux exopeptidases dans la troncation du peptide $A\beta$ en N-terminal, dans des modèles *in vitro*, *ex-vivo* et *in vivo*. Les résultats obtenus confortent l'idée que ces enzymes modifient le fragment $A\beta$ en des formes plus toxiques jouant sur les déclinés cognitifs, connue dans la pathologie. En effet, après avoir caractérisé les constructions shRNA et les lentivirus dirigés contre APA ou après le traitement chronique avec le RB150 (un inhibiteur pharmacologique d'APA), les résultats mettent en évidence qu'une diminution des formes tronquées d' $A\beta$ en région N-terminale améliore considérablement la maturation des épines dendritiques et les déclinés de mémoire spatiale. Biochimiquement, les souris présentent une dégradation d' $A\beta$ par une diminution drastique des plaques amyloïdes au niveau hippocampique ainsi qu'une baisse du niveau d' $A\beta_{pE3-42}$ (approche pharmacologique) et $A\beta_{1-42}$ (lentivirus) dans la fraction insoluble. En parallèle, DPP4 présente un rôle a priori plus complexe. En effet, les résultats par spectrométrie de masse et immunoprécipitation dénotent que DPP4 clive $A\beta_{40}$ en $A\beta_{3-40}$. L'approche lentivirale atteste d'une baisse significative du niveau de plaques amyloïdes et d' $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ dans la fraction insoluble en Elisa et d'une amélioration de l'apprentissage. Cependant, le traitement à la sitagliptine montre peu d'effets bénéfiques en tests comportementaux ou après analyses biochimiques. Par ailleurs, l'activité enzymatique d'APA et de DPP4 mesurée dans des cerveaux de patients montre une augmentation au stade précoce de la pathologie. L'ensemble de ces résultats renforce indéniablement l'implication de ces enzymes dans l'initiation et/ou le développement de la pathologie. APA et DPP4 se révèlent d'être des candidats intéressants pour des approches thérapeutiques visant à bloquer la formation des formes d' $A\beta$ s tronquées en région N-terminale.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, Amino-peptidase A, Dipeptidyl peptidase 4, $A\beta$ tronqués.

Abstract

The diversity of amyloid peptides (A β s) forms significantly contributes to the complexity of the pathology requiring a better understanding of their roles. Recently, their involvement in the initiation and worsening of Alzheimer's Disease (AD) seemed irrevocable, due to their strong presence in patients' brains. Studies have shown that the loss of these fragments, in particular the A β forms truncated at N-terminal end, considerably improve cognitive functions in several mouse models of the disease. The hypothesis of my project was to analyze the implication of two enzymes, so far little studied in this context, on the truncation of the A β peptide at the N-terminal region. Over these years, I have studied the role of 2 candidate enzymes: Aminopeptidase A (APA) and Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4).

During my thesis, I proved the influence of two exopeptidases in the truncation of the A β peptide in the N-terminal region with *in vitro*, *ex-vivo* and *in vivo* models. The results support the idea that these enzymes modify the A β fragment into more toxic forms by participating on cognitive declines, known in the pathology. In fact, after the characterization of shRNA constructs and lentiviruses against APA or after chronic treatment with RB150, the results show that a decrease in truncated forms of A β significantly improves maturation of dendritic spines and spatial memory declines. Biochemically, mice show a degradation of A β by a drastic decrease in amyloid plaques at the hippocampal level as well as a decrease in the level of A β_{pE3-42} (pharmacological approach) and A β_{1-42} (lentivirus) in the insoluble fraction by Elisa. In parallel, DPP4 presents a more complex role. Indeed, the results obtained by mass spectrometry and immunoprecipitation show that DPP4 cleaves A β_{40} into A β_{3-40} . The lentiviral approach shows a significant decrease in the level of amyloid plaques and an improvement in learning (Water Maze). Moreover, the enzymatic activity of DPP4 and APA in patient's brains shows an increase at the early stage of the pathology. APA and DPP4 are proving to be interesting candidates for therapeutic approaches aiming at blocking the formation of truncated A β forms at the N-terminal region.

Key words: Alzheimer's Disease, Aminopeptidase A (APA), Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4), A β forms truncated at N-terminal end.

à la mémoire d'un être cher »

Résumé vulgarisé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde entier et un remède efficace représente un enjeu majeur pour la société. Le manque de connaissances sur les éléments déclencheurs de la maladie ainsi que sur les acteurs la faisant progresser, explique les échecs successifs des traitements proposés. Cependant, les recherches récentes dévoilent des idées nouvelles sur le rôle de la voie toxique (amyloïdogène) dans la pathologie. En effet, la présence de multiples petites protéines telles que les formes A β s N- ou C-tronquées, A η - α , A η - β ... et leur potentiel agrégation démontre une neurotoxicité et rendent la compréhension de la maladie plus complexe.

Le but de ma thèse a donc été d'étudier le rôle de deux enzymes, nommées APA et DPP4, sur la formation des petites protéines A β tronquées en région N-terminale et d'identifier leur implication dans la pathologie. Concrètement, à partir de molécules inhibitrices diminuant l'activité des enzymes ou de petits ARNs réduisant leurs productions, mes travaux de thèses ont montré qu'APA et DPP4 sont impliquées dans la production d'A β s N-tronqués et qu'ils jouent sur la progression de la pathologie d'un point de vue symptomatique et anatomique.

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease worldwide and an effective treatment represents a major challenge for society. The lack of knowledge on the triggers components of the disease as well as on the key factors making it progress, succeeding failures in developing a cure. However, recent research is revealing new ideas about the role of the toxic pathway (amyloidogen) in pathology. Indeed, the presence of multiple small proteins such as N- or C-truncated A β s, A η - α , A η - β ... and their aggregation potential demonstrate neurotoxicity and make the understanding of the disease much more complex.

The aim of my thesis was to study the role of two enzymes, called APA and DPP4, on the formation of small A β proteins truncated in the N-terminal region and to identify their involvement in the pathology. Concretely, with inhibitory molecules decreasing enzymes activities or small RNAs reducing their production, my thesis work has shown that APA and DPP4 are involved in the production of N-truncated A β s and that they play on the progression of the pathology from a symptomatic and anatomical point of view.

Listes des publications et présentations orales

REVUE

Are N- and C-terminally truncated A species key pathological triggers in Alzheimer's disease?

Julie Dunys, **Audrey Valverde**, and Frédéric Checler
Published, Papers in Press, August 24, 2018, DOI 10.1074/jbc.R118.003999

PAPIER

Article en cours de soumission

Aminopeptidase A contributes to biochemical, anatomical and cognitive defects in Alzheimer's disease mice and is increased at early stage of sporadic Alzheimer's disease

A.Valverde, J.Dunys, D.Debayle, T.Lorivel, AS.Gay , B.Roques, S.Gervais, M.Chami et F.Checler

Article en cours de soumission

Dipeptidyl peptidase 4 accounts for Alzheimer's disease-like defects in a mouse model and its activity is increased in sporadic Alzheimer's disease brains.

A.Valverde, J.Dunys, C.Caillava, D.Debayle, T.Lorivel, AS.Gay , M.Chami et F.Checler

Articles hors projet de thèse :


Neurotoxicity of a Biopesticide Analog on Zebrafish Larvae at Nanomolar Concentrations

Ahmed Nasri, **Audrey J Valverde**, Daniel Broche, Catherine Desrumaux, Philippe Clair, Hamouda Beyrem, Laurent Chaloin, Alain Ghysen, Véronique Perrier
Int J Mol Sci. 2016 Dec 19;17(12):2137.doi: 10.3390/ijms17122137.


Analysis of CX3CR1 haploinsufficiency in male and female APP^{swe}/PSEN1^{dE9} mice along Alzheimer Disease progression

Hemonnot-Girard Anne-Laure*, **Valverde Audrey***, Hua Jennifer, Delaygue Charlène, Linck Nathalie, Maurice Tanguy, Rassendren François, Hirbec Hélène
(Accepté dans *Brain Behavior and immunity*, en cours de publication)


PRESENTATIONS ORALES

 AD/PD 2019, The 14th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases

- Présentation d'un poster – Mars 2019, Lisbonne

 7èmes Rencontres scientifiques et cliniques de la Fondation Alzheimer

- Présentation orale – Décembre 2018, Paris


 Réunion Francophone Sur la Maladie d'Alzheimer & Les Syndromes Apparentés

- Présentation d'un poster – Juin 2018, Lille
-


PRESENTATIONS SCIENTIFIQUES INTERNES ET VULGARISATION

 Retraite Scientifique IPMC 2018

- Présentation Poster Septembre 2018, Roquebrune/Argens

 Journées de l'Ecole Doctorale de Nice (JEDN) 2017

- Présentation d'un poster – Mai 2018, Nice

 La semaine du cerveau 2020

- Présentation orale – Mars 2020, Grasse

Remerciements

Dans un premier temps, je souhaite remercier les membres du jury : **Dr Krantic Slavica, Dr Delatour Benoit, Dr Rivera Santiago et le Pr Roques Bernard**, d'avoir eu la gentillesse d'accepter de juger mon travail et d'être venus lors de la soutenance orale déroulée le 10 Décembre 2020. J'espère que mon manuscrit vous aura donné satisfaction. Dans un second temps, je remercie le Dr **Nicolas Sergeant** et le Dr **Patrick Auberger** pour leur conseil durant les différents comités de suivi de thèse (CST) ainsi qu'au Dr **Luc Buée** (en tant que co-directeur de Thèse) pour son aide durant les CST et de m'avoir accueillie dans son laboratoire en 2019 avec un encadrement exemplaire et d'une grande gentillesse de la part de **Sabiha Eddarkaoui** et **Raphaëlle Caillierez**.

Ensuite, naturellement, je souhaite remercier chaleureusement ou avec une certaine chaleur ;) le Dr **Frédéric Checler** ou **Monsieur Checler** : un directeur de thèse comme je l'espérais, c'est-à-dire humain. Vous m'avez accordé votre confiance sans même me connaître, une jeune fille sortie de nulle part. Vous m'avez donné une chance d'obtenir le grade académique le plus élevé avec un projet innovant et je ne peux que vous en remercier. Un projet qui m'a été confié et dont j'espère avoir obtenu les résultats que vous espériez. En me remémorant mes cinq années dans la team FC, je ne vois actuellement que la joie et le bonheur que j'ai pu partager avec chaque personne dont vous. Les sifflements dans le couloir de caravane, les longues discussions de crêpes, le barbecue, Noël, vos 60 ans, les références aux inconnus, vos mots fétiches, vos blagues, la chanson de Bella ou le petit chemin qui sent la lavande, je pourrais écrire un roman ☺... C'est avec beaucoup d'émotions que je vous remercie encore une fois de m'avoir soutenue dans la vie professionnelle et aussi humaine.

Je continue en m'adressant au Dr **Julie Dunys**. Tu es une personne si gentille et calme, j'ai énormément aimé discuter avec toi sur tous les points, une encadrante exemplaire. Tu as toujours été là malgré que tu jongles entre deux occupations professionnelles. Dès que j'avais un problème, tu as toujours su m'écouter et me donner de bons conseils qui m'ont permis d'avancer dans le bon chemin. Merci aussi de m'avoir aidée pour les papiers, le manuscrit et l'oral de ma thèse, qui n'était/sera pas une mince affaire ☺.

Je souhaite continuer avec les talentueuses et superbes personnes que sont le Dr **Inger Lauritzen**, le Dr **Raphaëlle Pardossi** et le Dr **Mounia Chami**. Trois ingénieuses chercheuses qui par leur spécialité m'ont permis chacune de grandir et d'acquérir des connaissances. Je n'oublierai jamais mes discussions avec Dr **Inger Lauritzen** sur un papier le soir ou toutes nos discussions dans le D06 ou au coin café, avec son rire incroyable. Je n'oublierai pas, non plus, le Dr **Raphaëlle Pardossi** de m'avoir aidée dès le premier jour en m'amenant au laboratoire en voiture et de m'avoir toujours soutenue dans mes moments de doute et de peine. Et je n'oublierai jamais le Dr **Mounia Chami** pour m'avoir toujours motivée à me dépasser, à aller toujours plus loin dans ma vision de la recherche et de m'avoir toujours donné cette force de rigueur et de persévérance. Vous avez toutes les trois un cœur en or, même si rien ne vous était demandé, vous m'avez encadrée à plusieurs moments et ça, je ne peux que vous en remercier.

Bien entendu, je continue avec le Dr **Alves da Costa** avec qui j'ai toujours passé de très bons moments au coin café et en extérieur, toujours avec beaucoup de douceur et de bienfaisance. Et le Dr **Eric Duplan**, je te remercie de tous les karaokés que l'on a fait le vendredi soir en salle de culture ☺. Ta chaise de bureau sera de nouveau à toi à 100% malgré que je m'y sois assise une fois lol^^.

Et bien sûr, je vais remercier tous mes acolytes de paillasse d'hier et d'aujourd'hui. Tout d'abord, je vais parler de mes 2 compères le Dr **Alexandre Bourgeois** et le Dr **Renaud Bussière**. C'est deux gars, avec qui j'ai passé des heures et des heures à travailler, à jouer tel que SMITE ou SOMA, à rire, à voyager, à manger ☺ du saucisson ou des sushis, à m'engueuler mais à toujours me réconcilier. Je sais que je suis une personne avec une énergie débordante, une voix forte et un caractère parfois fort mais les gars, je peux vous dire que vous êtes vraiment des amis à 100% pour moi. Si c'était à refaire, je ne changerais rien sur notre amitié, juste peut-être mon arrivée où je m'y suis pas forcément bien prise.

Après les deux gars, partons sur deux géniales bestas : le Dr **Marion Tiberti** et le Dr **Wejdane El manaa**. Je me souviendrai toujours de nos supers moments Koh lanta party, Halloween avec le superbe moment maquillage avec Wejdane ou à Barcelona avec le resto et l'air bnb (photo avec la superbe vue) avec Marion. Vous avez été là quand j'en avais le plus besoin et vous m'avez redonné le sourire. Je vous kiffe ;)

Ensuite je continue ce roman, avec suspens.... Le Dr **Rouland Lila** et le Dr **Bécot Anaïs**. Superbes collègues de travail, ;) Lila je sais que tu aimes bien cet adjectif lol. Lila et Anaïs, en récapitulant tous mes moments passés avec vous, je ne vois rien que des rires, de l'aide et de la gentillesse. Lila, j'ai toujours aimé les fêtes chez toi, toujours festives et nos discussions qui m'ont aidée dans ma vie personnelle. Anaïs, j'ai toujours ressenti une amitié parfois compliquée vis-à-vis de certains événements mais toujours forte et je te dis merci de m'avoir aidée dans des moments compliqués de ma vie.

Après les doyens, je remercie les nouveaux ☺ PhD et post-Doc : **Elissa Afram, Charlotte Bauer, Aurore Bernardin, Dr Paula Kinoshita, Dr Fanny Eysert, Arnaud Mary, Ligia Ramos dos santos et Loan Vaillant-Beuchot**.

Elissa, malgré le fait, que l'on se connaît que depuis quelques mois, nos discussions avec toi ont toujours été enrichissantes. Nos dialogues sur des papiers (Journal club à deux), nos confidences m'ont beaucoup apporté. Etre à tes côtés au bureau m'a permis de connaître une fille avec le cœur sur la main.

Charlotte, merci simplement d'avoir été là. Tu es pour moi le moteur indispensable à l'avancement de tous les projets. Tu m'as permis de ne pas m'occuper des commandes, de la gestion des souris et des maxipreps. Cela m'a donné un temps considérable pour l'avancement du projet. Je te souhaite bon courage et bonne chance pour la thèse que tu viens de débiter.

Ah lalà, **Aurore Bernardin**, j'ai l'impression d'avoir mon double en face de moi comme avec Fanny. Je ne sais même pas quoi te dire à part que la team Vaucluse, en force... va me manquer terriblement. J'adore toutes nos discussions, tous nos moments passés ensemble, ton caractère franc et ta créativité. J'espère que je t'ai transmis comme il se doit, le peu de connaissance que j'ai ! Je t'ai transmis le flambeau comme tu m'as dit un jour, bisous ☺...

La petite Vauclusienne 2, le Dr **Fanny Eysert**. Une fille comme je les aime, pétillante, franche et avec une pointe de folie, toujours prête à faire plein de choses. Même si on s'était un peu perdue de vue avec ton départ dans le Nord lol^^, le fait de se retrouver maintenant, m'a montré qu'une amitié peut perdurer longtemps dans la vie.

Je vais continuer avec **Aranud, KOKO...** ah non **Arnaud** et **Denis, Mr Bretz...** ah non **Loan** ☺. Deux fortes personnalités, synonyme de perfection, travailleur, cuisinier, gentillesse et métalleux (tout un style ^^). Enormément de bons souvenirs avec vous, avec le scénario de l'hélicoptère et les autres vidéos, les rires avec Arnaud en salle virus avec notre découverte sur la manière d'avoir la peau douce ou le petit scotch sur la compote de pomme ;) .

Pour les doctorants, je vais finir avec nos belles brésiliennes, **Ligia Ramos dos Santos** et Dr **Paula Kinoshita**. Ligia, j'ai vécu une très belle rencontre avec toi. Une fille avec qui j'ai ri, cherchant l'amour sans qu'on lui pique des frites ☺... Ce grand amour avec la nourriture et surtout les BANANES ^^ . Paula je me rappellerai toujours de ta gentillesse et le colis à envoyer au Brésil où on a mis genre 2h à connaître tous les paramètres d'envois alors qu'il n'est même pas parti lol.

Hors de la FC team, je souhaite remercier beaucoup de personne de cet institut (ou en dehors) qui m'ont aidée à un moment ou à un autre et qui m'ont accordé de leur temps : **Amélie Cavard** (une amie avec un grand A, on n'est pas Monica et Rachel comme tu me l'avais dit ☺ mais on est le ying et le yang ;)), **Mr Moyse** (un responsable de Master 2 avec une gentillesse immensurable), **Corinne Kalfa** (secrétaire du tonnerre), **Catherine Le calvez** (gentillesse et soucieuse de notre sécurité), **Dr Carine Gandin** (ma copiiiiinne ☺), **Alain Barbot** (Animalier hors du commun), **Gauthier Alavoine** (grand cœur, amoureux des chats ;)), **Lucien Relmy** (gwada en mwen), **Nicolas Guy, Thomas Lorivel** (Duo de choc ;) et ingénieux statisticien), **Dr Joëlle Chabry** (Discussion sur les voyages et donneuse de cellules ☺), **Dr Maria Capovilla** (drosophiliste au top) , **Delphine Debayle, Anne-sophie Gay, Nathalie Leroudier, Lucile Fleuriot** (quatuor de femmes affectueuses), **Loic Broussot** (mon serpentard favoris), **Thomas Comtesse, Guillaume Diazano, Joris Leredde, Kévin Delanoë, Sébastien Delahye, Hugo Fofu** (Histology, microscopy ou sing club), **Dr Nadège Devaux, Dr Delphine Bichet** (responsable du projet SBEA tip-top), **Dr Ingrid Berthus** (Club Desigual ☺), **Marielle Jarjat, Nelly Durand** (responsables salle histo géniales), **Dr Renan Costa Campos** (guitariste hors du commun), **Dr Sylvain Feliciangeli, Dr Carole Rovere, Dr Frank Chatelain, Emmanuelle Deval, Gwenola Poupon-silvestre** (super souvenirs au Cordée de la réussite et à la Fête des sciences), **Dr Isabelle Lena** (Comportementaliste exemplaire), **Dr Jacques Barik** (23 mars Bernard ☺), **Dr Hélène Barelli, Dr Sophie Dufour-Beraud, Dr Sandrine Cestèle, Dr Mabrouka Doghman, Dr Fabrice Duprat, Dr Sébastien Fernandez, Sandra Dhifallah, Marine Gauthier, Marie Pronot, Clara Sanchez** (personnes d'une grande gentillesse à mon égard), **Frédéric Brau, Julie Cazareth, Sophie Abelanet** (plateforme cytométrie en flux et microspie au top), **Dr Michel Franco** (extincteur club), **Dr Bruno Mesmin** (Danseur professionnel à la retraite), **Franck Aguila, Damien Barbier, Nadine Loudig, Magalie Ceravolo, Valérie Briet** (Administration superbe), **Simon Szmidt** (Joueur invétéré), **Véronique Thieffin, Benjamin Donay** (Animaliers attentionnés), **Yohan Viani** (travailleur exemplaire), **Anne-marie Cerrini** (personnelle laverie avec une pêche d'enfer), **Dr Gilles Ponzio** (je ne pensais pas trouver qqn parlant plus que moi ☺), **Malika Arhatte** (Duo de choc avec Céline) et **Mme Brenner** (une professeur de Français dévouée et que je remercie sincèrement) .

Ensuite, je remercie tous mes potes du collège jusqu'à maintenant et de m'avoir supporté aussi longtemps. Je vous aime tous car vous avez chacun des qualités et des défauts qui m'ont permis de grandir, de m'épanouir et de vivre dans le bonheur. Forever dans ma vie et dans mon cœur : **Laura, David, Loïc, Thierry, Frédéric, Flo, Elrik, Angie ma poulette, mon poussin d'amour, Emma ma pichounette (BFF), vincent, Nawel, juju, Laura Bellutti, Sandy, Nico, Kévin, Moufida, Séb/perle, Cédric, Carole, Alexandre charagon, Adeline, Thibault, Margaux, Laura/vincent, Laeti /Gaby, adrien le marseillais, Jeremy Equinoxe, Jérémie Yorkmouth, Cécilia, Fanny Vialon, le filou et Mario**. Je souhaite remercier aussi mon informaticien préféré **Alessio** avec qui je partage ma vie depuis

presque un an. Heureusement que tu m'as aidée à créer une macro automatique de mes x photos ;), cela m'a fait gagner un temps considérable. Tu es celui que j'aime mais aussi mon confident, mon ami avec qui je peux tout dire. Durant ces années de thèse, j'ai aussi appris qu'il faut vivre chaque seconde de chaque journée car des imprévus peuvent tout bouleverser et certains de mes sacrifices sur mon plan professionnel m'ont éloignée de personne que j'aurais aimé ne pas perdre mais c'est la vie et il faut avancer. L'ensemble des galères vécues dans l'institut m'a frustrée, m'a montrée qu'il y a une large différence entre la théorie sur l'avancement d'un projet et la réalité, cela a été donc des années très dures psychologiquement mais je pense avoir su les surmonter. Je suis devenue en plus de chercheur débutant, un agent de nettoyage expérimenté et une experte en climatisation ;). J'ai enfin vraiment muri, développé un sens des responsabilités, de la rigueur et de la détermination dans mon travail.

Je n'aurais jamais réussi tout ça, sans ma **FAMILLIA** que j'aime plus que tout au monde. Ces années de Thèse ont été aussi des années de réflexion et de tristesse que je ne pourrais oublier. Cependant, j'ai reçu et je reçois tellement d'amour de mes parents et de mes proches que je ne peux qu'être heureuse et épanouie dans ma vie. J'ai une chance inouïe de vous avoir à mes côtés, d'être née dans vos bras et d'avoir reçu de vous des valeurs de droiture, de travail, de motivation, d'indépendance mais aussi de simplicité, d'amour pour mon prochain, de convivialité et d'humain. J'ai enfin accompli une chose que j'ai toujours voulu vous donner : ma réussite professionnelle.

« Le progrès de la science révèle la construction de l'Avenir de la civilisation »

Table des matières

RESUME	3
ABSTRACT	4
RESUME VULGARISE	6
LISTES DES PUBLICATIONS ET PRESENTATIONS ORALES.....	7
REMERCIEMENTS	9
TABLE DES MATIERES	13
LISTES DES TABLEAUX ET DES FIGURES.....	16
ABREVIATIONS	18
AVANT-PROPOS	20
INTRODUCTION.....	21
GENERALITES SUR LA MALADIE D'ALZHEIMER	22
A. <i>Historique</i>	22
B. <i>Diagnostics cliniques</i>	25
1. <i>Symptômes comportementaux</i>	25
2. <i>Evaluations neuropsychologiques</i>	26
3. <i>Analyses médicales : Biomarqueurs et Imagerie</i>	28
4. <i>Traitements thérapeutiques</i>	32
C. <i>Formes Familiales et Facteurs de risques</i>	34
1. <i>Formes Familiales autosomales dominantes</i>	35
(a) <i>APP</i>	35
(b) <i>Présénilines</i>	35
2. <i>Formes Sporadiques</i>	37
(a) <i>Facteurs de risques génétiques</i>	37
(b) <i>Facteurs de risques épigénétiques</i>	39
(c) <i>Facteurs de risques non génétiques et environnementaux</i>	41
D. <i>Lésions macroscopiques et dysfonctions moléculaires</i>	42
1. <i>Plaques séniles</i>	42
2. <i>Dégénérescences neuro-fibrillaires</i>	45
3. <i>Inflammation, Astroglie et Neurodégénérescence</i>	46
LA PROTEOLYSE AU CENTRE DE GRAVITE DE LA PATHOLOGIE	51
A. <i>Maturation protéolytique de la βAPP</i>	51

1. Fonctions et localisation cellulaire de la β APP	51
2. Protéolyse non-amyloïdogénique	58
3. Protéolyse amyloïdogénique	59
(a) β -sécrétases	59
i. Structure et trafic cellulaire	59
ii. Fonctions physiologiques et substrats	61
iii. Fonctions dans la formation des catabolites β APP : coupures β et β'	62
iv. Les inhibiteurs associés	63
(b) γ -Sécrétases	63
i. Structure et trafic cellulaire	63
ii. Fonctions physiologiques et substrats	65
iii. Fonctions dans la formation des catabolites de la β APP : coupure γ	65
iv. Les inhibiteurs associés à la γ -sécrétase	67
(c) Une nouvelle sécrétase : l'Eta-sécrétase	67
i. Structure et fonction des MMPs	67
4. Les fragments protéolytiques issus du clivage primaire de la β APP et leur implication dans la pathologie	71
(a) Les fragments sAPP α et sAPP β	71
i. Fonctions physiologiques	71
ii. Toxicité des fragments sAPP α et sAPP β	72
(b) Les fragments CTFs : C99/C83	74
i. Toxicité de ces fragments	74
ii. Agrégation des CTFs	77
(c) AICD	78
i. Fonctions physiologiques	78
ii. Toxicité de l'AICD	80
(d) Les peptides amyloïdes : A β ₄₀ et A β ₄₂	82
i. Fonctions physiologiques des peptides amyloïdes	82
ii. Pathogénicité d'A β s	85
iii. Qu'en est-il des formes oligomères d'A β	86
iv. Dégradation des peptides amyloïdes	89

(e) Les peptides amyloïdes N-terminaux : $A\beta_{11-x}$ et $A\beta_{17-x}$	94
5. Les fragments protéolytiques issus du clivage secondaire d' $A\beta$ et leur implication dans la pathologie.....	95
(a) Formes tronquées en C-terminal	95
i. $A\beta_{34}$	95
ii. $A\beta_{37}$, $A\beta_{38}$ et $A\beta_{39}$	96
(b) Formes tronquées en N-terminal	97
i. $A\beta_{2-x}$	97
ii. $A\beta_{4-x}$	98
(c) Formes particulières : $A\beta$ Pyroglutamate3-x.....	99
i. Enzyme impliquée dans la formation de l' $A\beta_{pE3-42}$: la glutaminyl cyclase.....	99
ii. Toxicité de ce fragment.....	100
PROJET DE THESE : CLIVAGES ENZYMATIQUES DE LA REGION N-TERMINALE D'AB	102
A. APA	103
1. Structure	103
2. Fonctions physiologiques et pathologiques.....	105
B. DPP4	108
1. Structure	108
2. Fonctions physiologiques et pathologiques.....	108
MODELES D'ETUDES « <i>IN VIVO</i> » DE LA MALADIE D'ALZHEIMER.....	112
OBJECTIFS GENERAUX	114
RESULTATS.....	116
A. REVUE :	117
B. ARTICLE 1 - Axe1 : Objectif et résumé.....	128
C. ARTICLE 2 – Axe 2 : Objectif et résumé	183
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	221
<i>Le rôle physiologique ou pathologique du peptide Aβ dépend-t-il seulement de sa concentration ?.....</i>	222
<i>Le rôle émergent des formes tronquées d'Aβ dans la maladie d'Alzheimer</i>	224
<i>Les enzymes, cœurs protéolytiques des catabolites toxiques dans la pathologie</i>	225
1. Rôle de l'Aminopeptidase A dans la Maladie d'Alzheimer.....	226
2. Rôle de la Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) dans la Maladie d'Alzheimer	230
<i>C99, catabolite plus approprié pour l'initiation de la pathologie ?.....</i>	235
<i>Perspectives thérapeutiques</i>	236
REFERENCES.....	238

Listes des Tableaux et des Figures

Figure 1 : Marquages histo-pathologiques aux sels d'argents d'Aloïs Alzheimer sur le cortex cérébral de John. F (D'après Möller et Graeber 1998)

Figure 2 : Chronologie des découvertes des composés des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Figure 3 : Chiffres estimatifs de la prévalence de déments en France selon le rapport d'Alzheimer Europe (Vanacore s. d.)

Figure 4 : Atrophies cérébrales chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer d'après Duncan et Valenzuela (Duncan et Valenzuela 2017).

Figure 5 : Distribution des marqueurs histopathologiques de la maladie d'Alzheimer selon Braak. (H. Braak et Braak 1991)

Figure 6 : Contributions Génétiques sur l'étiologie de la MA (Adapté d'après Lane, Hardy, et Schott 2018)

Figure 7 : Formation de plaques séniles (Adapté d'après Iadanza et al. 2018)

Figure 8 : Illustration schématique des modifications de la protéine Tau entraînant la formation des enchevêtrements neurofibrillaires. (Adapté d'après Almansoub et al. 2019)

Figure 9 : Lésions moléculaires impliquées dans l'initiation et l'aggravation de la maladie d'Alzheimer.

Figure 10 : Phylogénie des membres de la famille APP illustrant les événements importants au cours de l'évolution d'après Shariati et al, 2013. (ma : million d'années)

Figure 11 : Schéma de la traduction de la β APP et de ces modifications post-traductionnelles.

Figure 12 : Schéma des voies protéolytiques de la protéine β APP d'après Müller (Müller, Deller, et Korte 2017).

Figure 13 : Schéma illustratif de l'organisation structurelle de BACE1 et BACE2(d'après Riqiang Yan 2017)

Figure 14 : Assemblage du complexe γ -sécrétase (M. S. Wolfe 2019b).

Figure 15 : Voie de clivage des CTFs par la γ -sécrétase. (d'après M. S. Wolfe 2019)

Figure 16 : Récapitulatif de la localisation et des rôles des MMPs dans la voie amyloïdogénique (d'après Santiago Rivera et al. 2019)

Figure 17 : Schéma de la structure d'APP α et APP β (d'après Chasseigneaux et Allinquant 2012)

Figure 18 : Structure du C99 (Pantelopulos et al. 2018)

Figure 19 : Compétition conformationnelle du C99: homodimérisation ou liaison avec le cholestérol (d'après Y. Song et al. 2013)

Figure 20 : Interaction d'AICD avec les protéines adaptatrices (Inspirée de Grimm et al. 2013 ; Radzimanowski et al. 2008)

Figure 21 : Dégradation du peptide amyloïde (Inspirée de Baranello et al. 2015)

Figure 22 : Cartographie de l'expression de la protéine APA dans le cerveau. (D'après Demota)

Figure 23 : Inhibiteur pharmacologique spécifique d'APA

Figure 24 : Fonction de l'aminopeptidase A dans le système rénine-angiotensine (D'après x).

Figure 25 : Caractéristique structurelle de la Dipeptidyl-peptidase 4 (S. Shi, Koya, et Kanasaki 2016)

Figure 26 : Rôles de DPP4 dans les cancers (Beckenkamp et al. 2016).

Figure 27 : Chronologie des caractéristiques phénotypiques des souris 3xTg-AD.

Figure 28 : Hypothèse de projet

Figure 29 : Immunomarquages des formes $A\beta_{pE3-x}$ dans les cerveaux murins après traitement pharmacologique au RB150.

Figure 30 : Variation de l'activité enzymatique endogène d'APA dans les cellules neuronales et microgliales murines.

Figure 31 : Marquages des protéines agrégées et de l' $A\beta$ dans les souris 3xTg-AD, âgées de 15 mois traitées ou non avec le RB150.

Figure 32 : Immuno-marquage du peptide $A\beta_{42}$ dans les souris 3xTg-AD, âgées de 10-11 mois traitées ou non avec le RB150.

Figure 33 : Images représentatives des morphologies mitochondriales dans les souris 3xTg-AD shScr et shAPA.

Figure 34 : Effet bénéfique de l'inactivation d'APA sur la structure mitochondriale des souris 3xTg-AD.

Figure 35 : Test du Barnes Maze dans les souris 3xTgAD invalidées avec les shRNAs scramble ou DPP4

Figure 36 : Test de la piscine de Morris dans les souris 3xTgAD traitées ou non avec la sitagliptine.

Tableau 1 : Exemples de tests cliniques développés pour le diagnostic de la MA

Tableau 2 : Listes des thérapies et des cibles de la maladie d'Alzheimer.

Tableau 3 : Descriptions des différentes plaques séniles (Adapté d'après Greenfield's Neuropathology s. d.)

Tableau 4 : Modifications post-traductionnelles de BACE-1 d'après la revue (Koelsch 2017)

Tableau 5 : Les enzymes impliquées dans la protéolyse d'A β

Abréviations

3xTg-AD : modèle murin avec trois mutations transgéniques (APP, MAPT, PSEN)
ABAD: A β binding alcohol dehydrogenase
ABCA7: ATP Binding Cassette Subfamily A Member 7
ADA: Adenosine deaminase
ADAM: A Disintegrin And Metalloprotease
ADAMTS4: ADAM Metallopeptidase With Thrombospondin Type 1 Motif 4
ADAS: Alzheimer's Disease Assessment Scale cognitive subscale
ADL: activities of daily living
ADN: Acide DésoxyriboNucléique
ADRDA: Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
AFT: complexe nucléaire (AICD-Fe65-Tip60)
AGER/RAGE: Advanced Glycosylation End-Product Specific Receptor
AICD: APP IntraCellular Domain
AKT: protéine kinase B
AMP: Antimicrobial protein
AMPAR: α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid receptor
AMPK: AMP-activated protein kinase
APA/ENPEP: Aminopeptidase A
ApoE : Apolipoprotéine E
APP/ β APP: Amyloid Precursor Protein
APP-CTFs: APP-carboxy terminal fragment
ARIA: Amyloid Related Imaging Abnormalities
ARTFL: Advancing Research and Treatment in Frontotemporal Lobar
ATG: Autophagy related protein
AVP: Arginine VasoPressine
A β (o): amyloïde β éta (oligomère)
B16F-L: mouse melanoma cell
BACE: β -site APP cleaving Enzyme
BADL: basic activities of daily living
BHE: Barrière Hémato-Encéphalique
BIN 1: Bridging Integrator 1
BNP: brain natriuretic peptide
CAA: Cerebral amyloid angiopathy
CCL2/MCP-1 : chemokine (C-C motif) ligand 2
CD11 : Cluster de différenciation ou intégrine alphaX
CD249, gp160 ou EC3.4.11.7 : Aminopeptidase A
CD26/DPP4 et EC3.4.14.5 : dipeptidyl-peptidase 4/cluster de différenciation

CD2AP : CD2 Associated Protein
CD33 : myeloid-associated marker
CD36 : fatty acid translocase
CDC2 : gène de la cyclin-dépendant kinase 1
CHO: Chinese hamster ovary cell
CLU: clusterin
COX: Cyclo-oxygénase
CR1: Complement C3b/C4b Receptor 1
CREB: C-AMP Response Element-binding
CX3CL1/R1 : CX3C chemokine ligand/receptor
DAP12/TYROBP: DNAX-activating protein
DHPM: dihydropyrimidine
DNF: dégénérescence neurofibrillaire
DOCA-Salt : Deoxycorticosterone acetate-salt
DRP1: Dynamin-related protein 1
DUB: Deubiquitinating enzymes
E2-25K: Ubiquitin-conjugating enzyme E2 K
EAAT: excitatory amino acid transporter
EADI: European Alzheimer's Disease Initiative
EC33: ((S)-3-amino-4-mercapto-butyl silfonic acid
ECE: endothelin-converting enzyme
EDF: échelle de dysfonctionnement frontal
EPHA1: Erythropoietin-Producing Hepatoma Receptor A1
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
EWAS: epigénome-wide association studies
FAP α : Fibroblast activation protein- α
FPR2: Formyl peptide receptor 2
FTD: fronto-temporal dementia
GFAP: Glial fibrillary acidic protein
GLAST: GLutamate ASpartate Transporter 1
GLT-1: glutamate transporter 1
GnRH: Gonadotropin-Releasing Hormone
GSK-3 β : Glycogen synthase kinase 3
HAS: Haute Autorité de Santé
HMW: High molecular weight
IADL: instrumental activities of daily living (iADL)
IATI: Innotest Amyloïd Taux index
IL-1 β : Interleukine1- β
IRM: Imagerie par résonance magnétique
IWG: International Working Group
JNK: c-Jun N-terminal
LCR: Liquide Céphalo-Rachidien
LOAD: late-onset Alzheimer's disease
LRP1: LDLR-related protein
LTD : long term depression
LXA: lipoxin A
MCI: Mild Cognitive Impairment
MDA-MB23 I-L : Cellules épithéliales mammaires
MEC : Matrice ExtraCellulaire

miRNA : micro- Acide RiboNucléique
MMS: Mini Mental State
MPTP: 1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine
MS4s: Multiple Sclerosis
mTOR: mammalian target of rapamycin
NEP: néprilisine
NGS: Next-generation Sequencing
NIA-AA: National Institute on Aging and Alzheimer's Association
NINCDS: National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke
NKA α 3: Na⁺/K⁺-ATPase α 3
NMDA: acide N-méthyl-D-aspartique
NPY: Neuropeptide Y
OMS: Organisation Mondiale de la Santé
PGC-1 α : Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PICALM: phosphatidylinositol-binding clathrin assembly protein
PITX2: paired-like homeodomain 2
PrPc: cellular prion protein
PSEN1/2: Présiniline 1/2
PYY : Peptide YY
QC/QPCT : Glutaminyl cyclase
QTLs : Quantitative trait loci
RAAS/RAS : système rénine-angiotensine-aldostérone
RAPTOR: Regulatory-associated protein of mTOR
RARB: Retinoic acid receptor β
RCC: renal cell carcinoma
RL/TI-16items: rappel libre/ rappel indicé à 16 items
ROS : réactifs de l'oxygène
SD : Senile Dementia
SDF-1/CXCL12 : stromal cell-derived factor 1
SDS: sodium dodécylsulfate
SEP: Scleroses en plaque
SH-SY5Y: Neuroblastome
SORL1: Sortilin Related Receptor 1
SP: Senile Plaque
SPECT : Single Photon Emission
TBA2: Modèle murin surexprimant A β _{pE3-x}
TEP: Tomographie par Emission de Positons
TEP-FDG: TEP-Fluorodésoxyglucose
TFAM : Mitochondrial transcription factor A
TFEB: Transcription factor EB
TGF- β : Transforming Growth Factor - β
TLRs: récepteurs Toll-like
TM: transmembranaire
TNF- α : Tumor necrosis Factor
TREM2: triggering receptor expressed on myeloid cells 2

TRH: thyrotropin-releasing hormone
TX: Fractions au triton
U87-L: lignée cellulaire humaine cancéreuse de glioblastomes
UCHL1: ubiquitin C-terminal hydrolase L1
WT : Wild-type
 α 7nAChRs: α 7 nicotinic acetylcholine receptor
 α -IFN: Interféron

Avant-Propos

A partir du début du 20^{ème} siècle, des autopsies de patients montrant des troubles cognitifs, du langage et une désorientation a permis à Aloïs Alzheimer d'identifier les marqueurs histo-pathologiques de la maladie d'Alzheimer (MA). Il décrit pour la première fois, la présence d'agrégations de protéines en intra et extracellulaire. Quelques années plus tard, l'identification du peptide A β , de la protéine Tau et des mutations familiales ont donné lieu à une meilleure compréhension de la pathologie et au développement d'outils essentiels pour la recherche.

Actuellement, l'étiologie est toujours méconnue mais une forte avancée est tout de même présente sur les mécanismes impliqués dans la MA. Des biomarqueurs, des évaluations neuropsychologiques et des traitements non curatifs procurent aux patients et aux aidants, une aide rapide en ralentissant les symptômes grâce aux anti-cholinestérasés (seuls médicaments à ce jour). Cependant, approfondir les connaissances sur les mécanismes moléculaires et trouver une thérapie plus efficace semble être un besoin essentiel pour la civilisation. En effet, la MA est considérée être la maladie neurodégénérative la plus fréquente avec un coût économique mondial désastreux.

Au cours de ma thèse, je me suis donc intéressée à l'étude de l'aminopeptidase A (APA) et de la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) dans la troncation N-terminale du peptide A β (A β Nterm). En effet, depuis l'hypothèse de la cascade amyloïde, de nombreux essais cliniques ont échoué. Cibler simplement le peptide amyloïde ou les enzymes induisant sa formation ne semblent pas être efficace. L'hypothèse de mon travail repose donc spécifiquement sur les formes tronquées d'A β dans sa région N-terminale (A β Nterm). Beaucoup d'équipes révèlent que la composition majoritaire des plaques de patients atteints de la MA comporte plus de 70% de ces fragments. Par ailleurs, cette quantité d'A β Nterm semble spécifique à cette démence et ces fragments sont des espèces plus neurotoxiques et avec plus de propension d'agrégation qu'A β ₄₂. Déceler les enzymes spécifiques de cette coupure pourrait être une solution curative pour empêcher le développement de la MA

Dans ce manuscrit, l'introduction commencera par une brève présentation des connaissances générales de la MA. Par la suite, je développerai la protéolyse de la β APP donnant naissance au peptide A β . Je mettrai en lumière les connaissances actuelles sur toutes les espèces d'A β et sur les enzymes proposées dans le cadre de mon projet, agissant sur la région N-terminale d'A β .

INTRODUCTION

A. Historique

La rencontre d'Aloïs Alzheimer, médecin psychiatre et neurologue allemand, avec la patiente Auguste Deter en 1901 aura été un moment historique et initiateur sur la compréhension scientifique de la démence. En effet, ce jeune clinicien ne pouvait se douter que son nom allait être connu dans le monde entier après ses découvertes sur le lien entre la maladie du cerveau et la maladie mentale. En 1901 Auguste Deter a déclenché à l'âge de 50 ans, des symptômes de pertes de mémoire ainsi que des problèmes de relations sociales. Après son décès en 1906, Aloïs Alzheimer a examiné son cerveau (ainsi que celui d'un autre patient, John F.) avec l'imprégnation argentique et il a constaté la présence de plaques amyloïdes et d'enchevêtrements neurofibrillaires (Figure 1, Figure 2), même si ce n'est pas les termes employés à cette époque. L'ensemble de ces résultats a été présenté à la 37^{ème} conférence des psychiatres allemands à Tübingen avec pour titre « On the peculiar disease process of the cerebral cortex » et a permis la publication en 1910 dans le laboratoire du Dr Kraepelin, du premier article intitulé « Clinically and histologically peculiar mental disorders of old age » avec pour la première fois l'utilisation du terme « Alzheimer's Disease » (Möller et Graeber 1998).

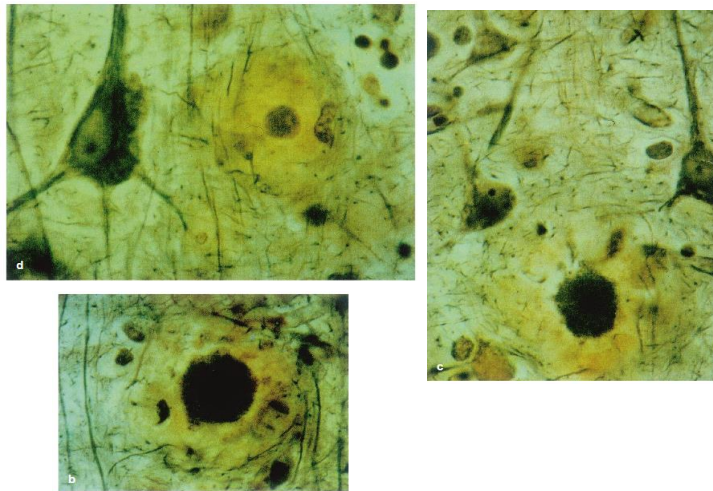


Figure 1 : Marquages histo-pathologiques aux sels d'argents d'Aloïs Alzheimer sur le cortex cérébral de John. F (D'après Möller et Graeber 1998)

Cependant, la composition de ces structures torsadées β plissées, observée par cristallographie aux rayons X était encore méconnue. En effet, dès 1854, le Dr Rudolf Virchow, histologiste

pathologique a introduit le terme « d'amylose », en référence à l'amidon (Grünfeld 1992; Lavergne-slove s. d.; Von Bertalanffy 1954) mais il faudra attendre les années 70-90 pour mettre au point une technique d'extraction et de purification correcte de la substance amyloïde dans les cerveaux des patients Alzheimer (Eanes et Glenner 1968; Glenner et Wong 1984b, 1984a; Schubert et al. 1968). En 1984, le Dr Glenner a permis de caractériser les 24 premiers acides aminés du peptide A β par chromatographie liquide à haute performance.

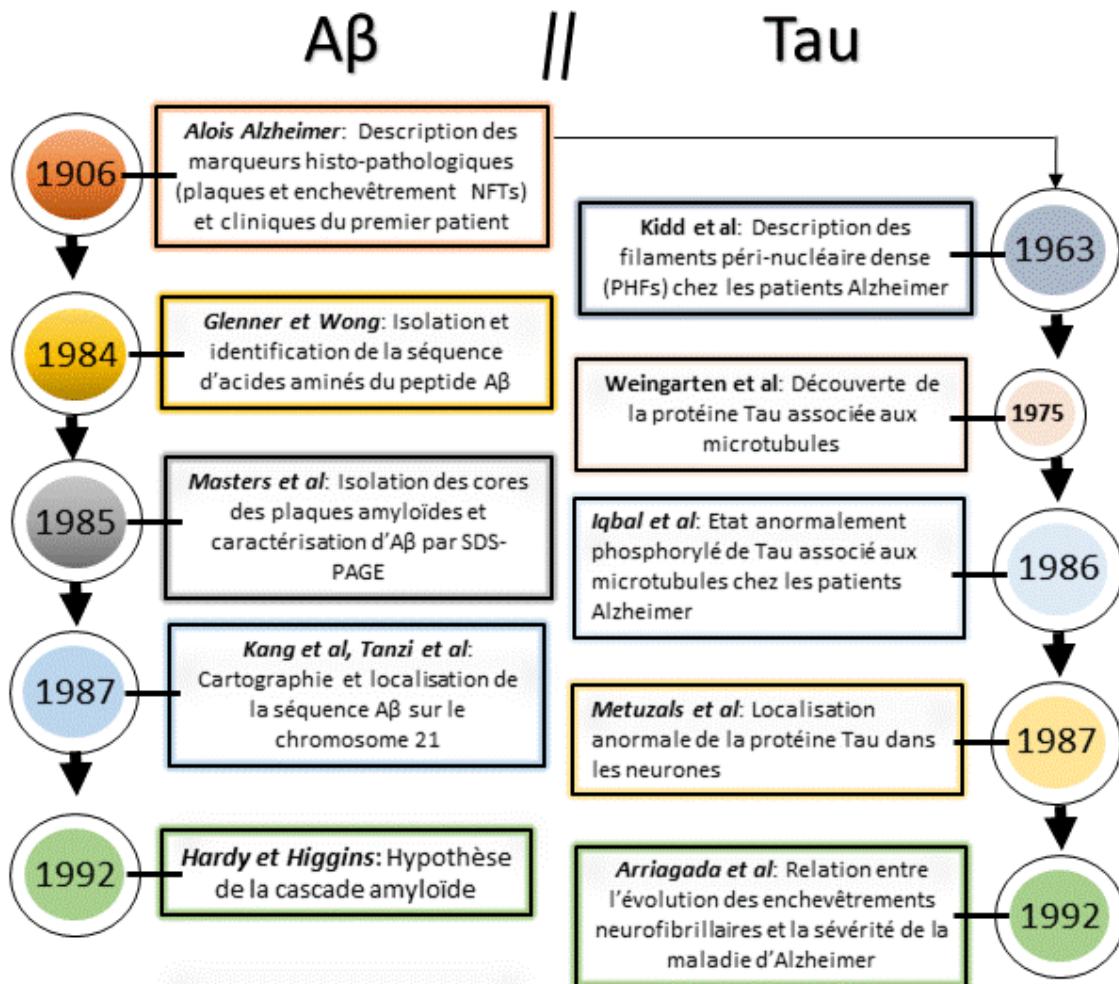


Figure 2 : Chronologie des découvertes des composés des plaques séniles et des enchevêtrements neurofibrillaires chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer.

Quelques années plus tard, plusieurs laboratoires ont permis de connaître sa séquence entière ainsi que sa localisation sur le chromosome 21 (Kang et al. 1987 ; Tanzi et al. 1987). La localisation précise d'A β sur le locus de l'APP dans le chromosome 21 va engendrer de multiples découvertes telles que les mutations sur le gène APP (développé dans la partie «

Formes familiales autosomales dominantes ») et sa formation. L'ensemble de ces études donnera naissance à l'hypothèse de la cascade amyloïde en 1992 (explicité dans la partie « Maturation protéolytique de l'APP »).

Parallèlement aux recherches d'identification des composants des plaques amyloïdes, des laboratoires ont analysé les enchevêtrements neurofibrillaires. En 1963 (Figure 2), la 1^{ère} description des filaments péri-nucléaires chez les patients a été réalisée par l'équipe du Dr Kidd (Kidd 1963), sans connaître la protéine impliquée. Ce n'est qu'en 1986, grâce au Dr Iqbal (Grundke-Iqbal et al. 1986) et après la découverte de la protéine Tau associée aux cytosquelettes des neurones (Weingarten et al. 1975), que l'on identifiera Tau comme une protéine anormalement phosphorylée chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer. En effet, la protéine Tau se localise dans des compartiments cellulaires qui contribuent aux dysfonctions. Une étude montre sa présence à l'extérieur mais également à l'intérieur de la membrane nucléaire des neurones (Johnson et Jenkins 1999). Les découvertes successives sur la structure, les modifications post-traductionnelles et la localisation de Tau montreront une relation étroite entre le nombre d'enchevêtrements neurofibrillaires et le degré de déficit cognitif (décrit dans la partie « dysfonctions moléculaires de la pathologie »).

L'évolution de la connaissance sur cette maladie est essentielle. Depuis le début du 20^{ème} siècle, l'augmentation de la longévité via l'amélioration de la qualité de vie et le progrès de la médecine a donné lieu à l'émergence des maladies liées à l'âge comme la maladie d'Alzheimer. Aujourd'hui en France, diverses ressources venant d'organismes (Fondation Alzheimer s. d.; France Alzheimer s. d.; OMS-organisation mondiale de la santé s. d.) estiment à 2 236 682 le nombre de personnes atteintes de démence en 2050, soit 3.31% de la population (Figure 3). Cette estimation dénonce l'importance de mieux comprendre ces pathologies mais particulièrement la maladie d'Alzheimer car elle est à l'origine de 60 à 70% des cas de démence. Par ailleurs, ces chiffres révèlent aussi l'enjeu économique et sociétal car il sera de plus en plus difficile d'aider chaque malade.

France en 2050

Tranche d'âge	Nombre de personnes	Homme	Femme	Dément		Total de personnes démentes
				Homme	Femme	
30-59	23506357	11569746	11936611	18512	10743	29255
60-64	3949366	1895258	2054108	3791	18487	22277
65-69	3872300	1837249	2035051	20332	30533	50866
70-74	3551578	1665011	1886567	51576	64195	115771
75-79	3652856	1678477	1974379	117108	176249	293357
80-84	3218348	1413374	1804974	150771	235592	386363
85-89	2478327	1008078	1470249	164244	365366	529610
90+	2036392	683536	1352856	202978	606205	809184
Population totale	67586729	3,31% de la population = 2 236 682				

Figure 3 : Chiffres estimatifs de la prévalence de déments en France selon le rapport d'Alzheimer Europe (Vanacore s. d.)

B. Diagnostics cliniques

1. Symptômes comportementaux

Majoritairement, la maladie d'Alzheimer est connue pour la perte de mémoire. Cependant, beaucoup de laboratoires mettent en évidence que la pathologie a une période dite asymptomatique et prodromique, c'est-à-dire des étapes sans symptômes ou avec des symptômes paraissant comme bénins. La phase prodromique se réfère par des problèmes de langage et une perte de mémoire épisodique n'affectant pas la vie quotidienne d'un individu et dépend aussi de l'âge auquel la maladie est contractée (Dubois et al. 2010). Par ailleurs, la complexité du diagnostic est de déterminer qu'un patient présente bien une maladie d'Alzheimer et non une autre démence car énormément de maladies neurodégénératives ont les mêmes symptômes et l'étiologie est encore méconnue. Il a même été observé que des personnes sans déficits cognitifs au cours de leur vie disposaient de biomarqueurs positifs pour la pathologie (Bennett et al. 2006, **développé dans la partie B.3**).

Malgré de multiples inconnues et controverses, les médecins catégorisent les patients comme « Alzheimer » selon un ensemble de symptômes référencés et déterminés par des évaluations neuropsychologiques et médicales (**développé en B.2 et B.3**). Tout d'abord, la perte de mémoire est un phénomène progressif au cours duquel l'individu aura des difficultés à se

rappeler d'événements de la vie quotidienne tel qu'un rendez-vous chez le médecin. On parle donc d'une amnésie légère. Par la suite, l'individu développe ces défaillances jusqu'aux stades sévères et irréversibles. Les symptômes amènent à oublier la localisation de sa maison, les dates d'anniversaire ou même le nom de ses enfants. Ces signes de troubles de la mémoire, de désorientations spatio-temporelles et de gnosies rendent l'individu dans la dépendance de ses proches (Atri 2019; Sultzer et al. 2014)

D'autres symptômes, plus subtils, peuvent indiquer au médecin qu'un patient est en phase symptomatique pré-démontielle ou MCI (Blenkinsop et al. 2020). En effet, les patients acquièrent des troubles de l'humeur comme l'anxiété ou la dépression. Des études parlent même d'une relation étroite entre les symptômes de la dépression et la démence précoce (Wiels, Baeken, et Engelborghs 2020). Ils acquièrent également de l'aphasie, de l'apraxie et de l'apathie. Ces symptômes correspondent à une perte de langage, l'individu a du mal à tenir une conversation, à une perte de coordination motrice et à un désintérêt à toute activité ou loisir. Des cas avérés et réguliers ne montrent pas de problèmes de mémoire en premier lieu comme dans cette étude (Koedam et al. 2010) où une personne de 62 ans avait des troubles de langage et a été classée dans un premier temps en SD (patient atteint de maladie démente) au vue d'une atrophie diffuse sévère. Mais par la suite, elle a développé des troubles de la mémoire épisodique et des troubles d'apraxie visuo-spatiale.

2. Evaluations neuropsychologiques

Pour diagnostiquer un individu et depuis de nombreuses années, les médecins disposaient des critères du National Institute of Neurological and Communicative Disorders and Stroke (NINCDS) et de l'Alzheimer's Disease and Related Disorders Association (ADRDA, McKhann et al. 1984). De nos jours, la recherche a consolidé le raisonnement du diagnostic par la découverte de biomarqueurs du liquide céphalo-rachidien et de l'imagerie amyloïde par émission de positons. Cela a donné naissance à de nouveaux critères (Morris et al. 2014) : le IWG, le IWG-2 (International Working Group, Dubois et al. 2007, 2010, 2014 ; Strupp et al. 2007) en 2007 et le NIA-AA (National Institute of Aging and Alzheimer's Association; Frisoni, Winblad, et O'Brien 2011; Ihara 2016) en 2011. Ces critères de diagnostic se composent d'une batterie d'examen cliniques et paracliniques permettant le dépistage de la maladie d'Alzheimer de manière précoce et l'évaluation de sa progression. Pour prendre au mieux en charge le patient devant la suspicion d'une maladie d'Alzheimer après le premier entretien, des évaluations des troubles fonctionnelles et neuropsychologiques (tests cognitifs,

psychiques et comportementaux), recommandées par la Haute Autorité de Santé, sont à disposition des médecins spécialistes (Guide du HAS s. d.).

Les évaluations fonctionnelles (Jekel et al. 2015) déterminent les déficits de la vie quotidienne, appelés ADL (Activities of Daily Living). Pour déterminer ces difficultés, deux examens nommés BADL (Basic Activities of Daily Living) et IADL (Instrumental Activities of Daily Living) sont réalisables. Généralement, les individus présentent des difficultés à s'entretenir soi-même comme prendre un bain ou à prendre des transports publics et faire les magasins qui sont des pratiques plus complexes. Les évaluations neuropsychologiques sont quant à elles, beaucoup plus nombreuses et parfois combinées dans des cohortes pour améliorer l'identification d'un malade, évaluer la progression de la pathologie et la catégoriser avec certitude (Chapman et al. 2010 ; Green et al. 2011). En premier lieu, les patients sont examinés par des tests évaluant la mémoire épisodique et sémantique tels que le RL/TI-16items ou le RI-48items. Ensuite, le patient subit des tests psychiques et comportementaux. Les tests pouvant évaluer une dépression ou un trouble affectif sont les critères DSM-IV-TR et les échelles NPI (Neuropsychiatric Inventory) et EDF (échelle de dysfonctionnement frontal). Pour finir, l'individu effectue des tests évaluant sa cognition. Le test le plus connu est le MMS (Mini-Mental State) et il s'est imposé grâce à sa rapidité et l'étendue des fonctions explorées (Derouesne et al. 1999 ; Folstein, Folstein, et McHugh 1975). Ce test est composé d'une série de questions distribuées en 7 sous-catégories : l'orientation dans le temps, l'orientation dans l'espace, le rappel immédiat de trois mots, l'attention, le rappel différé des trois mots, le langage et les praxies constructives. De nombreux autres tests ont été développés à partir des connaissances actuelles pour distinguer un individu MCI d'un individu Alzheimer et identifier plus précocement un patient atteint de la pathologie (Tests détaillés dans la [Tableau 1](#)). La différence entre les tests est principalement le nombre de catégories spécifiques pour la cognition et celle du comportement, la définition des catégories des patients et les modèles algorithmiques employés.

3. Analyses médicales : Biomarqueurs et Imagerie

En parallèle à l'évaluation neuropsychologique, les médecins ont accès principalement à 7 tests paracliniques (Budelier et Bateman 2020) appuyant le diagnostic clinique d'un patient. Généralement, ils procèdent à l'IRM structurelle (Ossenkoppele et al. 2020) qui peut mener à l'identification d'une atrophie hippocampique, corticale temporale, pariétale et frontale selon l'évolution de la pathologie (Figure 4). Ces atrophies sont souvent corrélées avec les stades de Braak (Figure 5), c'est-à-dire en fonction de l'évolution de la distribution d'A β et de Tau, et la mort neuronale. Macroscopiquement, le volume hippocampique est réduit de 10 à 12 % chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer. Cependant, l'outil de diagnostic pouvant décrire une MA est le taux de réduction annuel de l'hippocampe car son atrophie est présente dans le vieillissement normal. A contrario, la réduction volumique du cortex temporal médial constitue un meilleur marqueur topographique d'identification des sujets souffrant de MCI évoluant vers une MA.

<i>Tests Cliniques</i>	<i>Références</i>	<i>Descriptions des Tests</i>
MoCA	(Nasreddine et al. 2005)	Tâche cognitive rapide, sensible et facile sur 10 domaines différents et plus sensibles à la détection des individus MCI que le MMS
ADAS	(A new rating scale for Alzheimer's disease 1984)	Présence de 40 items (Fonctions mémoire, langage, reconnaissance des mots, taches de praxies et comportements non – cognitifs avec la dépression, activité motrice, etc..)
ADAS-Cog	(Mohs et al. 1997 ; Raghavan et al. 2013)	Items d'ADAS non informatives enlevées et supplémentés par des mesures cognitives destinées au MCI
CDR-sb	(Das, Rana, et Roy 2018 ; McLaughlin et al. 2010 ; Yagi et al. 2019)	Distinction entre les patients NL, MCI et AD et indicateur de la progression
CERAD	(Hallikainen et al. 2014)	8 thèmes sur l'apprentissage de mots, la mémorisation, la reconnaissance des mots, la praxie, le test de l'horloge....

Tableau 1: Exemples de tests cliniques développés pour le diagnostic de la MA

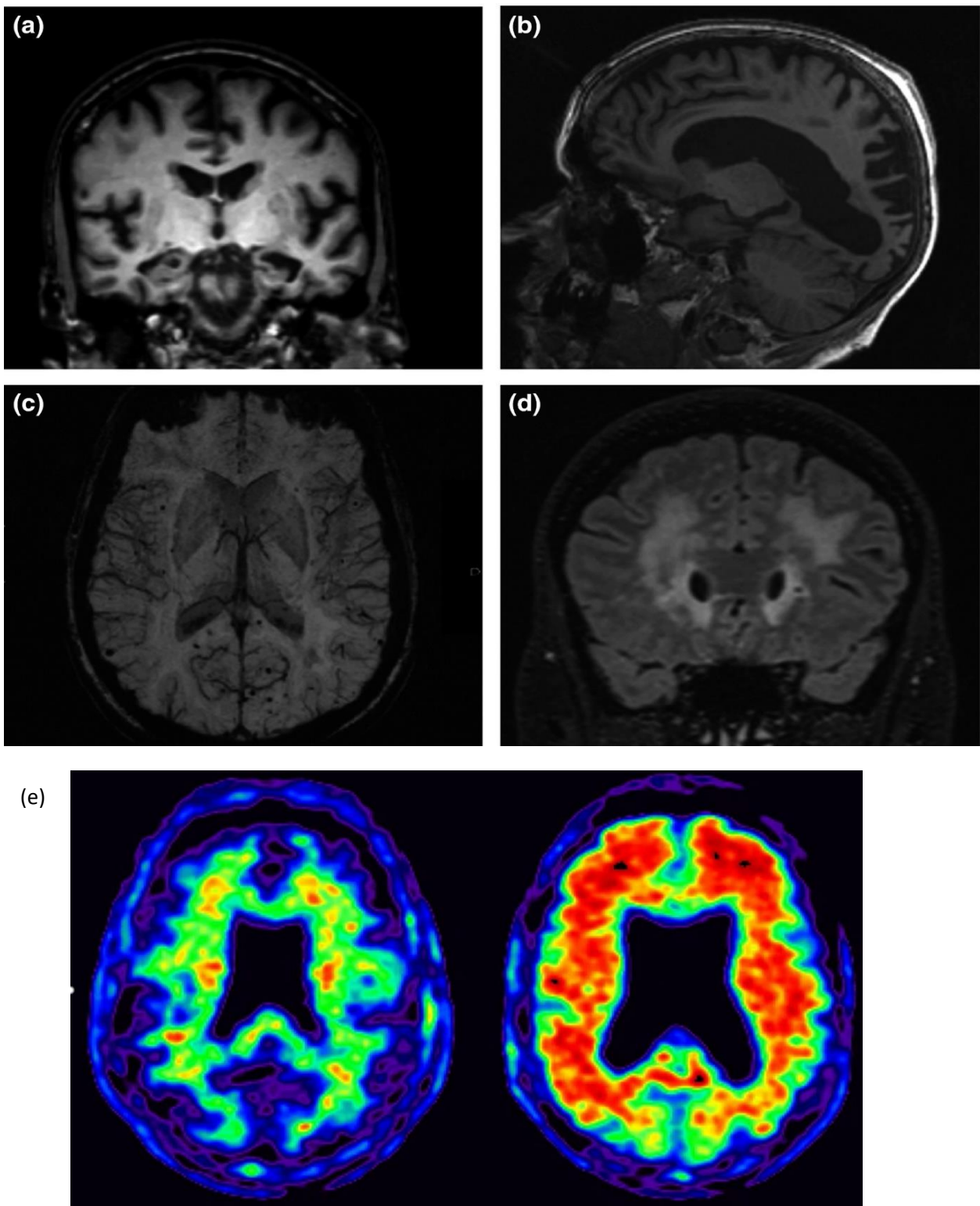
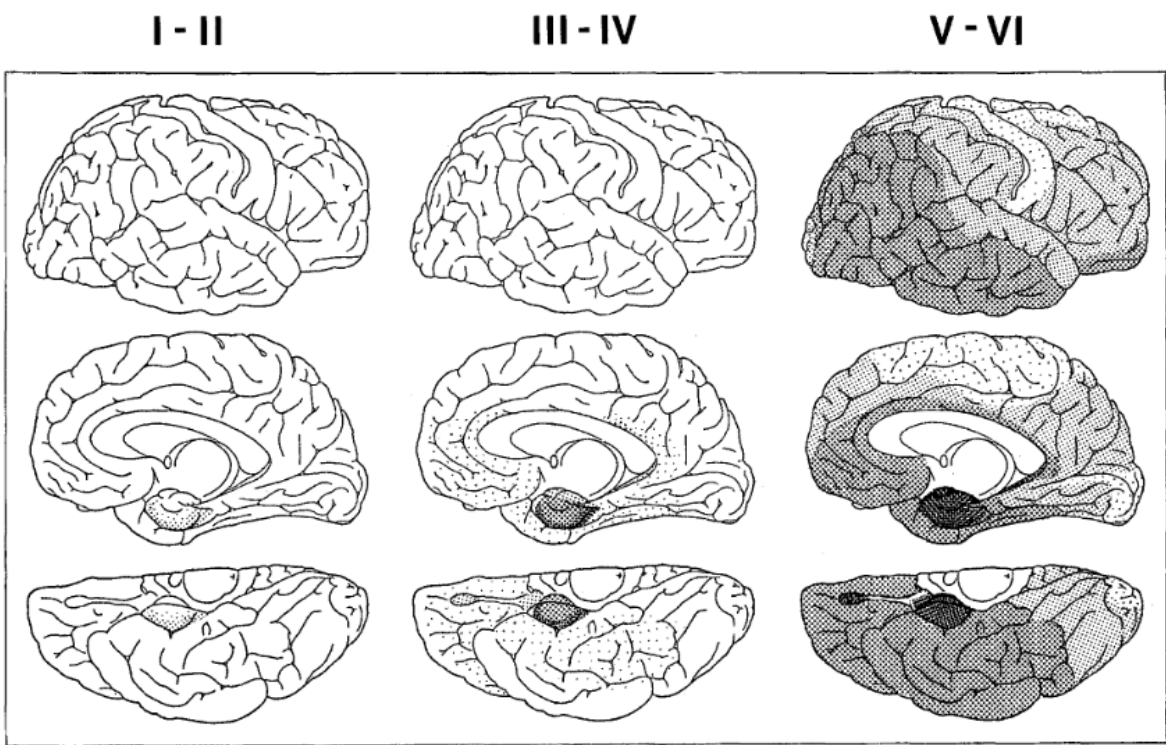


Figure 4: Atrophies cérébrales chez un patient atteint de la maladie d'Alzheimer d'après Duncan et Valenzuela (Duncan et Valenzuela 2017). (a,b,c,d) Images d'IRM caractéristiques de l'atrophie hippocampique, pariéto-occipital, d'une angiopathie amyloïde cérébrale et d'hyper-intensités péri-ventriculaires et sous-corticales de la substance blanche. (e) TEP amyloïde au Flortbetapir, patient contrôle (gauche) vs patient MA (droite).

1



2

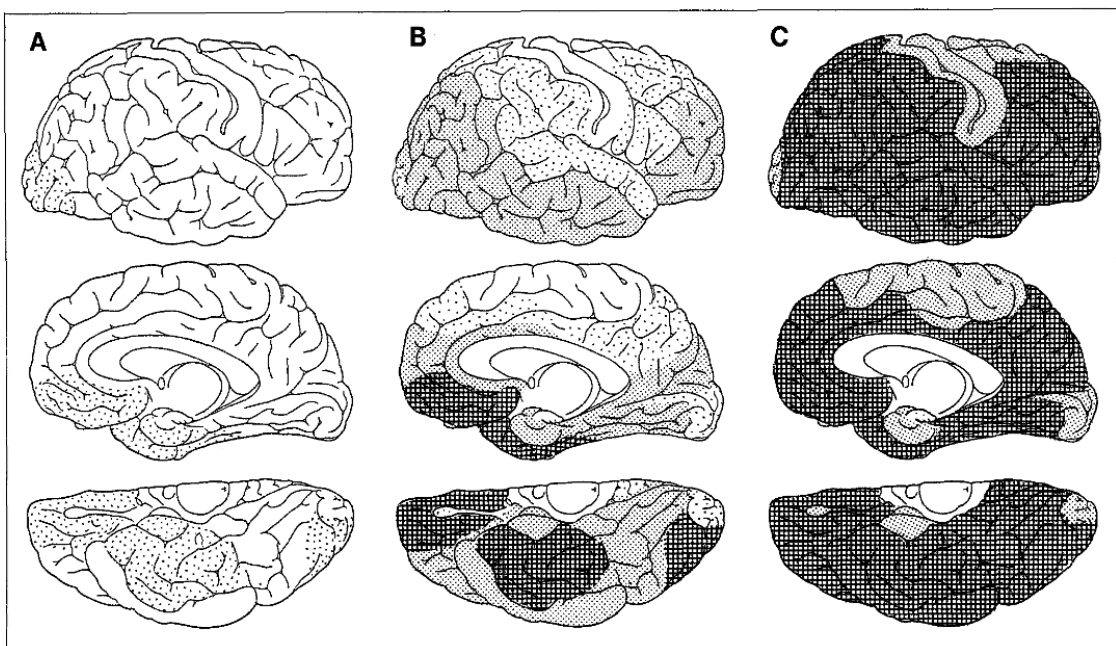


Figure 5: Distribution des marqueurs histopathologiques de la maladie d'Alzheimer selon Braak. (H. Braak et Braak 1991). 1- Représentation des enchevêtrements neurofibrillaires dans les différents stades (I-II : Cortex trans-entorhinal ; III-IV : Cortex entorhinal, trans-entorhinal et limbique ; V-VI : Isocortex). 2- Représentation de l'amyloïde dans les différents stades (A, I-II : portion basal de l'isocortex ; B, III-IV : zones associées à l'isocortex ; C, V-VI : Tous l'isocortex.)

Le deuxième biomarqueur utilisé est l'imagerie fonctionnelle en SPECT et TEP-FDG. Cette technique permet d'obtenir des informations sur le métabolisme glucidique neuronal. Dans les zones atrophiées, on peut constater une hypoperfusion du cortex temporo-pariétal et du cortex cingulaire représentant souvent le pattern observé dans les MA (Sarazin 2012). Les dernières techniques, pouvant être pratiquées, servent à mesurer les marqueurs physiopathologiques c'est-à-dire Tau, Phospho-Tau_{Thr181} et A β (Bibl et al. 2012 ; Bousiges et al. 2018). Grâce à une ponction lombaire, il est possible d'évaluer la concentration de ces différents déterminants de la pathologie dans le liquide céphalo-rachidien. Cela permet d'estimer la charge lésionnelle ainsi que le pronostic évolutif de la pathologie. Dans les sujets MA, il y a une diminution de 50% de l'A β ₄₂ sans doute par son agrégation et/ou la diminution de la clairance lymphatique de ce peptide (Magnin et al. 2017). A l'inverse il y a une augmentation de la concentration de Tau totale et phosphorylée. La combinaison des trois marqueurs permet une spécificité à 90% de la maladie d'Alzheimer grâce à l'index « IATI » (Innotest Amyloid Taux index) représentant le ratio de l'A β ₄₂ sur la protéine Tau totale (< à 0.8). Pour s'associer à ces résultats, les cliniciens utilisent les TEP-Tau et A β grâce des composés radioactifs injectés. Généralement, ce sont les composés PIB (Pittsburg compound B) ou Florbetapir qui quantifient visuellement la charge en plaque amyloïde et qui sont le plus manipulés (Figure 4). De manière plus récente, des outils marquant la protéine Tau (Schwarz et al. 2018) ont été développés car beaucoup de chercheurs montrent que l'évolution de l'agrégation de Tau concorde mieux avec la neuro-dégénération et les déclinés cognitifs (La Joie et al. 2020). La [¹⁸F] flortaucipir permet de tracer la charge en Tau agrégée dans le cerveau et il a été observé que l'augmentation globale de la charge corticale de Tau dépendait cependant de l'A β (Ossenkoppele et al. 2018; Pontecorvo et al. 2019). Actuellement d'autres tests sont aussi étudiés tels que l'intégrité de la matière blanche par IRM de diffusion (Dong et al. 2020), le dosage de Phospho-Tau_{Thr181} dans le plasma (Advancing Research and Treatment for Frontotemporal Lobar Degeneration (ARTFL) investigators et al. 2020) ou l'utilisation de l'imagerie magnéto-encéphalographique pour les courants post-synaptiques (Ranasinghe et al. 2020) et ont montré un fort potentiel comme nouveau biomarqueur de la pathologie

4. Traitements thérapeutiques

Selon la Haute Autorité de Santé (HAS), le traitement médicamenteux est autorisé et peut être proposé au patient selon la gravité de la pathologie et en fonction du rapport bénéfice/risque du traitement envisagé (Guide du HAS s. d.). Pour un stade léger ($MMSE > 20$), un inhibiteur de la cholinestérase est prescrit (donépézil, galantamine ou rivastigmine), pour les stades modérés ($10 < MMSE < 20$) des inhibiteurs de la cholinestérase et des antagonistes des récepteurs NMDA (NMDAR, mémantine) peuvent être donnés et pour les stades sévères, seulement l'antagoniste NMDAR est recommandé (Unité de soins, d'évaluation et de prise en charge, Alzheimer- Livre Blanc 2018). Cependant, en France et depuis Août 2018, le Ministère de la santé a décrété l'arrêt du remboursement de ces quatre médicaments dits inefficaces. Pourtant plusieurs associations ont interrogé les familles des malades et plus d'une personne sur deux a constaté une aggravation de l'état des malades. En effet, ces médicaments sont non curatifs mais ralentissent, selon certains spécialistes, la perte de mémoire. Actuellement, plusieurs approches thérapeutiques sont développées pour obtenir un médicament curatif. On dénombre plus de deux cents drogues (Thérapeutiques sur Alzforum s. d.) touchant diverses cibles telles que des inhibiteurs cholinestérasés, A β , Tau, PDE, MAO (Monoamine oxydase), MMP... (Tableau 2). En effet les progrès sur la compréhension de la pathologie permettent une diversification des cibles thérapeutiques et dénotent de sa complexité (Xie et al. 2020).

Quelques exemples d'hypothèses thérapeutiques seront approfondis (Cummings et al. 2017). La première hypothèse ayant vu le jour est celle des inhibiteurs de cholinestérasés. Elle a débuté dans les années 70 et plusieurs équipes ont montré des fluctuations de l'activité de l'acétyl-cholinestérase et de la butyryl-cholinestérase ainsi qu'une interaction avec la cascade amyloïde, l'hyperphosphorylation de Tau, la neuro-inflammation et l'apoptose (Hampel et al. 2018). Le défaut actuel des médicaments commercialisés vient de l'action courte sur les cibles et de leur interaction avec d'autres cibles telles que BACE1. Les nouvelles drogues pour cette hypothèse sont extraites de produits naturels (acide férulique, pteryxine) tel que le café ou sont combinées avec d'autres composés (sélénate dérivé du DHPM) jouant sur l'amyloïde, les anti-oxydants, les MAOs ou la mélatonine. Cette thérapie combinatoire (J. Yang et al. 2020) donnerait des meilleurs effets sur les symptômes que lorsque les composés sont séparés.

<i>Hypothèses de perspectives thérapeutiques</i>	<i>Cibles</i>	<i>Approches</i>	<i>Références</i>
Cholinergique	AchE, BChE	Inhibition	(Herrik et al. 2016)
Amyloïde	A β , BACE1, γ -sécrétase, ABAD, SSTR	Immunothérapie, inhibition, anti-aggrégant, modulateur	(B.-L. Zhu et al. 2019)
Tau	Tau, GSK-3 β , CDK-5, Acétylation de Tau	Inhibition, stabilisateur, immunothérapie	(Yanamandra et al. 2015)
Stress oxydatif	MAO, Métaux	Inhibition, chélateur	(Q. He et al. 2018)
Excitotoxicité	NMDA, GABA, PDE, COX-2	Antagoniste, régulateur	(Garay et Grossberg 2017)
Endocannabinoïde	Cannabinoïdes	régulateur	(D. Schubert et al. 2019)
ApoE	ApoE	régulateur	(Suidan et Ramaswamy 2019)
Autres	PPAR- γ , CREB, 5-HT, MMP	Agoniste, modulateur, inhibition	(Hong, Xu, et Zhai 2018)

Tableau 2: Listes des thérapies et des cibles de la maladie d'Alzheimer.

La thérapie dirigée contre la protéine Tau est beaucoup plus récente, entre autres par l'absence de modèles animaux pendant de nombreuses années (Jadhav et al. 2019). La stratégie actuelle est le développement d'une immunothérapie passive ou active ou d'un inhibiteur de la polymérisation de protéines (Congdon et Sigurdsson 2018). En effet des anticorps peuvent être injectés, se diriger directement sur une forme hyper-phosphorylée de Tau et ont principalement quatre domaines principaux de fixation (région N-terminale, C-terminale, région se liant aux microtubules et région riche en proline). Dans le cas des inhibiteurs de polymérisation, le TRx0237 en phase 3 (Panza et al. 2016) est une molécule inhibitrice de l'agrégation de Tau, ayant une bonne pharmacodynamique et une forme proche du bleu de méthylène, molécule utilisée pour la Malaria. Des études montrent que le Bleu de méthylène a des actions bénéfiques sur les formes fibrillaires de Tau, sur l'autophagie, sur la clairance d'A β et sur la mémoire spatiale (Xin et al. 2018a).

Pour terminer, je développerais l'hypothèse thérapeutique ciblant le peptide A β et ces formes tronquées (Hung et Fu 2017). En effet, le développement de drogues dirigées sur la cascade amyloïde a engendré énormément de problèmes et de questionnements (Cummings, Feldman, et Scheltens 2019). L'une des premières idées a été de créer des inhibiteurs dirigés contre BACE1 mais la plupart des inhibiteurs ne traversaient pas la barrière hémato-encéphalique, vu l'encombrement stérique de son site catalytique. Après la génération de différentes molécules pour pallier ce problème, plusieurs d'entre elles avaient une courte action sur BACE1, ne se liaient pas correctement avec BACE1 ou entraînaient de l'hépatotoxicité (Maia et Sousa 2019). L'ensemble de ces difficultés ont découragé de nombreuses compagnies pharmaceutiques qui se sont dirigées sur d'autres approches pour diminuer l'impact du peptide A β . Les nouvelles perspectives (Folch et al. 2018) se portent sur l'inhibition, la clairance et l'agrégation d'A β , sur la modulation de la γ -sécrétase par une action directe ou indirecte avec les MAOs, sur l'inhibition de l'ABAD (Benek et al. 2018), sur les chélateurs de métaux et sur des anticorps dirigés spécifiquement sur les formes tronquées d'A β . Par exemple, les dérivés de la coumarine ont un fort impact sur l'agrégation d'A β et sur la MAO-B qui module la γ -sécrétase. D'une autre façon, des études précliniques ou de phase 1/2 visent la forme tronquée pyroglutamate-3 A β (Crehan et al. 2020 ; Lachno et al. 2015) par des anticorps monoclonaux et démontrent un effet bénéfique sur la cognition, sur l'activation gliale et sur la clairance du peptide A β .

C. Formes Familiales et Facteurs de risques

Dans la maladie d'Alzheimer, l'étiologie est toujours considérée comme principalement méconnue même si cette pathologie est actuellement jugée comme multifactorielle avec 70% de causes génétiques et 30% de causes environnementales. Dans les causes génétiques (Guyant-Maréchal, Campion, et Hannequin 2009), les formes familiales autosomales (EOAD = maladie d'Alzheimer précoce) montrant une maladie d'Alzheimer avec des symptômes précoces représentent seulement 2% des malades. Cependant, les découvertes génétiques dans les années 1980-1990 (Rudolph E. Tanzi 2012), ont permis une aire révolutionnaire sur la compréhension de la pathologie avec la révélation des mutations sur 3 gènes (*APP*, *PSEN1* et *PSEN2*, plus de 400 mutations) montrant l'importance de la cascade amyloïde, la génération de catabolites toxiques ainsi que d'un A β d'une plus grande longueur (Szaruga et al. 2017) et permettant la création de nombreux outils essentiels dans ce domaine.

1. Formes Familiales autosomales dominantes

(a) APP

Depuis 1983 (Rudolph E. Tanzi 2012) et l'effort de multiples chercheurs tels que l'équipe de James F. Gusella (St George-Hyslop et al. 1987; Rudolph E. Tanzi et al. 1987) ou celle de John Hardy (Goate et al. 1991), ont permis de mettre en évidence la première mutation sur *APP* (V717I, London) et le lien entre les mutations sur le gène *APP* et les formes familiales avec une apparition précoce des symptômes (Hardy 2017). A ce jour, on compte plus d'une cinquantaine de mutations sur ce gène après le séquençage des exons 16 et 17. La plupart de ces mutations engendrent des modifications sur le ratio d' $A\beta_{42}/A\beta_{40}$, sur la fibrillogénèse du peptide, son oligomérisation et son agrégation. Les mutations se trouvant entre la position 714 et 717 de la protéine APP (London, German, French...) entraînent une augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$. Cette hausse provient d'une augmentation d' $A\beta_{42}$ et/ou d' $A\beta_{40}$ par altération des fonctions de la γ -sécrétase. Les mutations en position 693 tels que E693G (Arctic) ou E693Q (Dutch), génèrent la formation de protofibrilles du peptide et accélèrent donc sa propension à l'agrégation et à la toxicité. La mutation « Flamande » expose les malades à un dépôt du peptide $A\beta$ à la fois dans les vaisseaux sanguins et en plaque sénile. Et les mutations en position 677 et 678 (Tottori, English) causent principalement une accélération de l'oligomérisation du peptide amyloïde. Cependant plus récemment, l'équipe de Ryan J. Watts et de Kari Stefansson a dévoilé une mutation protectrice de la pathologie (Jonsson et al. 2012). La mutation islandaise touchant le deuxième acide aminé du peptide $A\beta$ entraîne un effet bénéfique sur la cognition et révèle une fréquence plus élevée chez les patients contrôles que chez les patients atteints de MA. Cette mutation favoriserait le clivage α -sécrétase à celui de la β -sécrétase, ce qui se traduit par une diminution des catabolites de la voie amyloïdogène (Carmona, Hardy, et Guerreiro 2018; Giri, Lü, et Zhang 2016).

(b) Présénilines

A l'inverse d'APP qui est le substrat des catabolites toxiques contribuant à la pathologie, les présénilines font partie d'un complexe protéique agissant sur APP. Il existe deux isoformes de cette protéine : PSEN1 et PSEN2 (développé dans la partie « Maturation Protéolytique de l'APP »).

Les mutations sur le gène *PSENI* (Kelleher et Shen 2017) représentent plus de 60% des mutations autosomiques dominantes pour la MA. Après la révélation d'un nouveau locus de forme familiale MA dans le chromosome 14 (Schellenberg et al. 1992), plus de 300 mutations sont aujourd'hui répertoriées. Dans la plupart des cas, il s'agit de mutations ponctuelles de type faux sens dans les exons 5,6,7 et 8. Ces modifications sur *PSENI* provoquent généralement des formes sévères de MA précoce. Par exemple, la mutation Pro117Leu est associée à une pathogénicité entre l'âge de 24 et 33 ans (Wisniewski et al. 1998). Phénotypiquement, les mutations sur le gène *PSENI* provoquent une MA associée avec une paraplégie spastique, une anomalie de substance blanche, une ataxie cérébelleuse et des troubles du comportement. Plusieurs études démontrent que les modifications de cette protéine affectent son activité, sa stabilité (Szaruga et al. 2017) et son hydrophobicité. Ces changements modifient le ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (augmentation), diminuent le plus souvent la quantité d' $A\beta_{42}$ et d' $A\beta_{40}$ (L. Sun et al. 2017), forment des plaques de type « Cotton Wool », une perte neuronale hippocampique, une diminution de la plasticité synaptique et affectent les fonctions neuronales en touchant l'activité de GSK3- β et la motilité de la kinésine 1 (Carmona, Hardy, et Guerreiro 2018; Giri, Lü, et Zhang 2016).

Les dernières mutations autosomiques reportées dans ce manuscrit, sont situées sur le gène *PSEN2* (51 mutations) et sont associées avec une MA qui peut être précoce ou tardive (Levy-Lahad et al. 1995 ; Rogaev et al. 1995). Les mutations pathogènes dénotent un défaut d'activité de la γ -sécrétase et se traduisent par une augmentation du ratio d' $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ avec la surproduction d' $A\beta_{42}$ et la diminution de l' $A\beta_{40}$. Cependant, des études entrevoient de nouvelles pistes d'actions de certaines mutations. En 2012, une équipe coréenne a analysé l'impact de la mutation N141I dans des modèles cellulaires et *in vivo*, et ils ont détecté une augmentation de l'expression et de l'activité β -sécrétase, une accumulation de l' $A\beta_{42}$ et l' $A\beta_{40}$ et une activation de la voie ERK avec la génération de ROS (M. H. Park et al. 2012). Plus récemment, une équipe italienne a indiqué un lien entre la mutation *PSEN*^{T122R} et le défaut autophagique dans cellules SH-SY5Y. Il semblerait que cette mutation bloque le trafic ainsi que la fusion autophagosome-lysosome en affectant Rab7 et en altérant l'homéostasie calcique (Fedeli et al. 2019).

2. Formes Sporadiques

La majorité des patients présente une maladie d'Alzheimer dite sporadique c'est-à-dire avec une étiologie irrégulière, néanmoins l'âge est considéré comme étant un élément clé au développement de la pathologie (Rudolph E. Tanzi 2012, LOAD = maladie d'Alzheimer tardive). En dehors de ce facteur, les avancées récentes ont pu déterminer trois grandes familles de facteurs de risques causant cette démence : les facteurs génétiques, épigénétiques et environnementaux.

(a) Facteurs de risques génétiques

Le premier facteur de risque génétique étudié provoquant une forte susceptibilité de LOAD, est ApoE (Suidan et Ramaswamy 2019; Verheijen et Sleegers 2018). Les premières découvertes révèlent l'implication du chromosome 19 dans la MA et les résultats du Dr Corder (Corder et al. 1993) indiquent qu'une copie de l'allèle *ApoE-ε4* est présent dans 64% des MA sporadiques et 80% des MA familiales. L'isoforme *ApoE-ε4* augmente trois fois le risque de développer la pathologie avec une seule copie ou douze fois avec les deux copies. A l'inverse l'allèle *ApoE-ε2* a un effet protecteur pour l'avancement de la pathologie. La protéine ApoE (J.-T. Yu, Tan, et Hardy 2014) est une glycoprotéine de 299 acides aminés et est principalement exprimée dans le foie et le cerveau. Plus précisément, ApoE se situe dans les cellules gliales de l'hippocampe, de la médulla, du cervelet et du cortex cérébral. Dans l'ensemble, ApoE joue un rôle critique dans le métabolisme et le transport des lipides ainsi que dans la clairance du peptide amyloïde et la réponse inflammatoire induite par Aβ (Ferguson et al. 2020; Theendakara et al. 2018; C. Wolfe et al. 2018).

Cependant *ApoE* n'est pas l'unique facteur de risque connu pour la MA (Figure 6). Les récentes avancées technologiques sur l'analyse du génome (J. H. Kim 2018) telles que les études d'association pangénomique (GWAS), la méta-analyse, les QTLs ou le NGS ont détecté plus d'une vingtaine de gènes associés à la MA qui sont répartis principalement dans trois voies moléculaires : le métabolisme des lipides, la réponse inflammatoire et l'endocytose (Giri, Lü, et Zhang 2016). En dehors d'*ApoE*, les gènes impliqués dans le métabolisme du cholestérol sont *ABCA7* et *CLU*. Ces protéines jouent toutes un rôle sur le peptide Aβ. Des études établissent que Clu est une protéine chaperonne extracellulaire présente dans les plaques amyloïdes en interagissant avec le peptide Aβ et est associée avec le ratio tau/Aβ dans le CSF (the European Alzheimer's Disease Initiative Investigators et al. 2009). *Abca7* est quant à

elle, impliquée dans l'élimination du peptide amyloïde par phagocytose et dans la régulation de la protéolyse d'APP (Pimenova, Raj, et Goate 2018).

Dans la MA, les principaux facteurs de risques génétiques jouant sur la réponse inflammatoire regroupent *CRI*, *CD33*, *TREM2*, *MS4s*. Ces protéines agissent sur l'immunité en régulant la phagocytose, le flux calcique, en facilitant l'endocytose indépendante de la clathrine et en modulant la réponse inflammatoire. Dans la MA, *TREM2* est de plus en plus étudiée car elle représente un déterminant moléculaire clé dans la réponse du SNC via l'accumulation d'A β (European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al. 2013). Physiologiquement, l'activation de *TREM2* via son interaction avec *DAP12* (protéine classée aussi comme facteur de risque) promeut la survie cellulaire, la prolifération, la phagocytose et une fonction immune normale (C. Wolfe et al. 2018). Des mutations homozygotes perte de fonction de *TREM2* causent la maladie Nasu-Hakola. Cependant un variant rare hétérozygote du gène tel que R47H, prédispose un individu à la MA (T. Jiang et al. 2013a). Dans plusieurs études *in vivo*, *TREM2* est surexprimée dans les microglies au bord des plaques séniles et un KO *TREM2* ou une déficience de *DAP12* dans des modèles murins de MA engendre un changement morphologique des plaques avec un core moins dense et moins fibreux ainsi qu'une amélioration de la clairance d'A β (Yeh et al. 2016). Par ailleurs, les patients ayant le variant R47H montrent le même phénotype sur l'aspect des plaques et ont une variation de *TREM2* soluble dans le LCR. Cette modification de *TREM* soluble ouvre au développement et à l'utilisation de cette protéine comme biomarqueur de la neuro-inflammation pour diagnostiquer la MA (Ulland et Colonna 2018).

Le dernier groupe de facteurs génétiques touche le processus d'endocytose (Guimas Almeida et al. 2018). Une détérioration du trafic peut endommager la transmission synaptique et entraîner un dommage neuronal. Les gènes impliqués dans l'endocytose et influençant le clivage protéolytique de l'APP incluent *BIN 1*, *CD2AP*, *PICALM*, *EPHA1* et *SORL1*.

Dans la MA, des études ont constaté une diminution de *PICALM* chez les patients qui engendre un défaut de clairance d'A β et des APP-CTFs via l'autophagie. En effet, les variants de *PICALM* sont identifiés comme étant protecteurs de la MA car la protéine *CALM* est requise dans la transcytose et la clairance d'A β et de Tau, dans l'endocytose de l'APP et de la γ -sécrétase et dans la dégradation lysosomiale des APPCTFs (Pimenova, Raj, et Goate 2018).

Sorla, quant à elle, est une protéine sous-exprimée chez les patients à cause de la méthylation du gène et elle est associée avec une atrophie hippocampique et une altération du niveau d'A β dans le LCR. En condition physiologique, *Sorla* se lie directement avec APP pour réduire la protéolyse d'APP dans les endosomes et la production d'A β par transport rétrograde vers le

réseau trans-golgien. Les variants de *SORL1* entravent cette fonction et amènent donc à une augmentation de la protéine APP dans les endosomes et à la formation du peptide A β (Q. Sun et al. 2017).

Pour finir, *BINI* est déterminé comme étant le deuxième facteur de risque génétique induisant avec une forte probabilité, une LOAD. Cette protéine est impliquée dans de multiples mécanismes mais les variants de ce gène induisant l'augmentation de l'expression de Bin1 concordent avec une augmentation de la quantité de Tau, s'associent avec un défaut de l'épaisseur du cortex entorhinal et du lobe temporal et contrôlent la production d'A β en régulant le trafic et l'accumulation de BACE1 dans les endosomes précoces (Carmona, Hardy, et Guerreiro 2018).

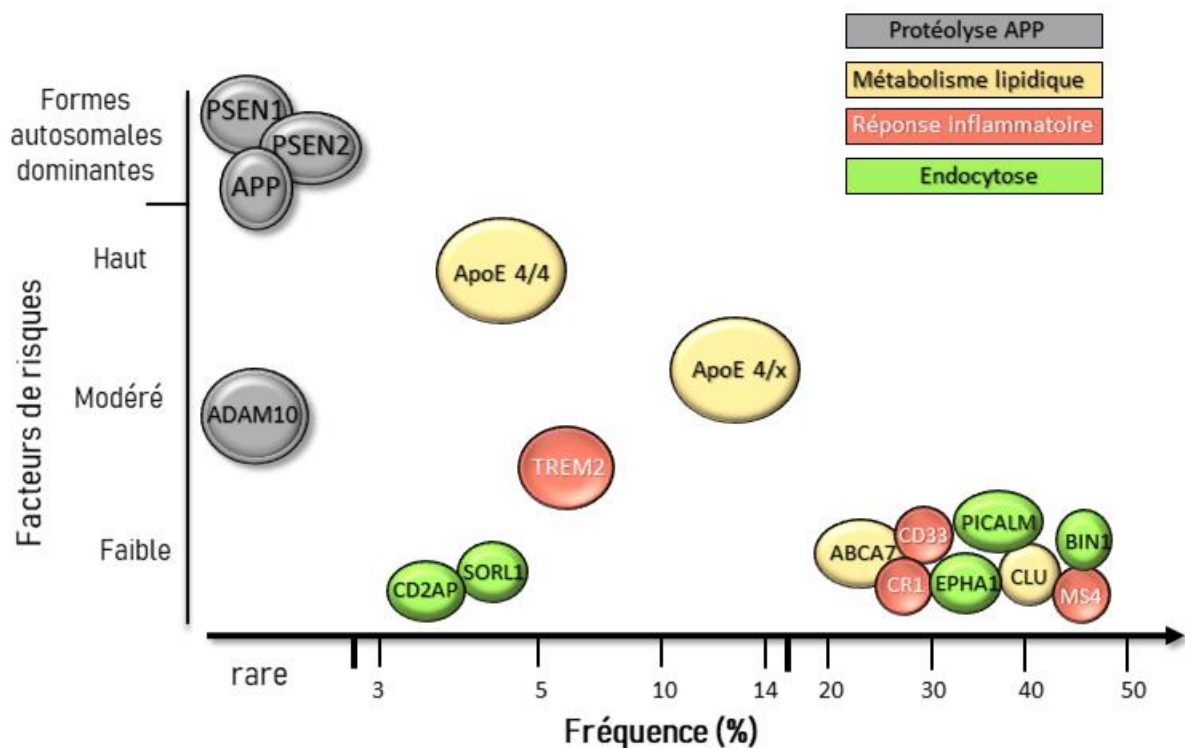


Figure 6: Contributions Génétiques sur l'étiologie de la MA (Adapté d'après Lane, Hardy, et Schott 2018)

(b) Facteurs de risques épigénétiques

Les facteurs épigénétiques (Stoccoro et Coppèdè 2018) correspondent à une altération de l'expression allélique de certains gènes sans modification de la séquence codante, due à des facteurs environnementaux (ex: Plomb) et sont transmissibles. Les modifications épigénétiques

regroupent la méthylation de l'ADN, le remodelage chromatinien et la modulation des gènes par les ARNs non codants (miRNA).

La méthylation de l'ADN est le mécanisme épigénétique le plus largement étudié. Les enzymes DNA methyltransférases ajoutent un groupement méthyl sur une cytosine (5-hmc) ayant une configuration CpG (cytosine phosphate guanine). Ce processus a une forte influence sur le neuro-développement, la stabilité du génome et les maladies neurodégénératives. La recherche dans ce domaine s'est portée, dans un premier temps, sur les gènes reliés à la démence c'est-à-dire *APP*, *PSEN1*, *PSEN2* mais aussi *MAPT* et *APOE*. Chez les patients MA, les résultats des signatures épigénétiques sont assez controversés et rendent difficile la compréhension de leur implication. Cependant, il a été observé, dans la plupart des cas, une hypo-méthylation globale (5-mc et 5-hmc) chez les patients MA (Chouliaras et al. 2013 ; Lashley et al. 2015). Avec les avancées sur les gènes impliqués dans la LOAD, des équipes ont analysé la méthylation sur *TREM2* et *BDNF*. Ces gènes subissent une hyper-méthylation (Celarain et al. 2016 ; Nagata et al. 2015) et représentent des biomarqueurs potentiels pour la maladie. Dans le cas des études EWAS, permettant d'effectuer un lien entre la méthylation de l'ADN et la MA, les publications mettent en évidence des loci impliquant des gènes associés avec la plasticité synaptique, les plaques neuritiques et les enchevêtrements neurofibrillaires (Bernstein et al. 2016 ; De Jager et al. 2014 ; Lunnon et al. 2014 ; Zhao et al. 2017).

Le deuxième facteur épigénétique traite du remodelage chromatinien via les histones. Ces protéines regroupées en octamères subissent des modifications post-traductionnelles et sont altérées chez les patients MA. En ce qui concerne l'acétylation des queues des histones (Nativio et al. 2018), elle est souvent augmentée pour les protéines H3 et H4 (Narayan et al. 2015) et l'altération de l'acétylation a pu être retrouvée dans des régions promotrices telles que *BACE 1* (K. Zhang et al. 2012). Ces découvertes ont débouché à la création d'inhibiteurs d'HDACs et plusieurs d'entre eux, diminuent le niveau d'A β et améliorent la mémoire spatiale dans des modèles *in vivo* (Sung et al. 2013). L'expression des ARNs non codants est aussi modifiée et contribue à la pathogénicité MA. Divers auteurs démontrent que les miRNAs sont requis et impliqués dans la régulation de *BACE1*, dans le métabolisme lipidique, dans la neuro-inflammation et dans le processus de mémorisation (Provost 2010; Qian et al. 2019). Par exemple, miR29 est significativement réduit chez les malades et cela corrèle avec une surexpression de *BACE1* et la production des sAPP β (Absalon et al. 2013 ; Hebert et al. 2008 ; Lei et al. 2015).

(c) Facteurs de risques non génétiques et environnementaux

De nombreuses études examinent l'implication des facteurs environnementaux sur le développement de la pathologie (A. Armstrong 2019 ; Killin et al. 2016 ; Rahman et al. 2020). Simplement, l'ensemble de ce que l'on respire, mange, boit, ainsi que les chocs physiques ou psychologiques, sont des éléments connus pour être des facteurs déclenchant la maladie. En effet, plusieurs publications examinent l'impact du NO_x, CO, O₃, de la fumée de cigarette et des particules (Moulton et Yang 2012). Une exposition chronique à des polluants constituant l'air, augmente l'incidence de développer la MA de 2 à 3 fois.

Une mauvaise nutrition est aussi considérée comme étant une source néfaste dans la MA. Les facteurs nutritionnels tels que l'obésité, les carences en vitamines, le microbiote (C. Jiang et al. 2017), les métabolismes lipidiques, le diabète, l'ingestion de pesticides et de certains métaux sont combinés avec la LOAD. En effet, des publications rapportent un lien entre le volume du lobe temporal médian, l'IMC et la MA (Hayes et al. 2020). Concernant le diabète, une forte concentration de sucre dans le sang entraîne une résistance à l'insuline et une hyperglycémie. Cela conduit à un stress oxydatif, une dérégulation du métabolisme lipidique, une réponse inflammatoire et une augmentation du niveau d'A β dans le cerveau via BACE1 et les canaux K_{ATP}. De plus, les patients Alzheimer ayant un diabète révèlent un niveau important de produits AGEs (Advanced Glycosylation End-Product) comparés aux patients sains (Baglietto-Vargas et al. 2016). A propos des déséquilibres lipidiques, plusieurs équipes témoignent des changements de niveau de cholestérols, de sphingolipides et d'acides gras saturés et insaturés. Ces modifications compromettent l'intégrité de la BHE, la réponse inflammatoire et la modulation du clivage d'APP et accélèrent la propagation de la pathologie en stabilisant BACE1 dans les endosomes et en augmentant la sécrétion d'exosomes (Di Paolo et Kim 2011). Pour finir, l'ingestion de métaux ou de pesticides induisent une toxicité neuronale, une augmentation des ROS et une production d'A β via une surexpression des protéines APP/BACE1 ou via une réduction de la NEP (néprilysine; Kao et al. 2020).

Le dernier facteur environnemental détaillé portera sur la consommation de vin et de café (Larsson et Orsini 2018; Reale et al. 2020). Certaines molécules (polyphénols, caféine) dans ces boissons produisent des effets bénéfiques intervenant dans la MA. Les polyphénols ont une activité anti-oxydante créant une réponse anti-inflammatoire dans le cerveau et le cœur. La caféine cause une activation des cellules microgliales, protège la BHE et réduit les déficits cognitifs en diminuant la production du peptide amyloïde.

D. Lésions macroscopiques et dysfonctions moléculaires

L'examen macroscopique d'un patient MA montre une diminution globale du poids des différents lobes corticaux à l'exception du lobe occipital ainsi que des lésions positives (plaques amyloïdes, enchevêtrement neurofibrillaire) et des lésions négatives (perte neuronale et synapses). L'accumulation concomitante de Tau_s et $\text{A}\beta_s$ contribue fortement aux lésions négatives, c'est-à-dire à la neurodégénérescence. Plus récemment des découvertes, à la fois moléculaires et macroscopiques, dévoilent l'importance des cellules gliales dans la neuro-inflammation et la propagation de la pathologie ainsi que les dysfonctions mitochondriales et de dégradation (Serrano-Pozo et al. 2011). Je développerai chacun de ces aspects dans les différentes sous-parties.

1. Plaques séniles

Depuis l'observation de ces marqueurs histo-pathologiques, plusieurs études ont permis de mieux comprendre la formation, la constitution, la morphologie et la répartition des plaques amyloïdes dans le cerveau (Dickson 1997). Le peptide $\text{A}\beta$ est produit naturellement dans le cerveau et a des rôles physiologiques (développé dans la partie maturation protéolytique de l'APP,3g). Cependant, son agrégation extracellulaire émane d'un changement de propriété structurelle en se configurant en brins β -plissés (Figure 7). Ce type de modification structurelle n'est pas seulement destiné pour ce peptide, la recherche a détecté d'autres protéines (ex : α -Synucléine) effectuant cette transformation et s'agrégeant dans le tissu nerveux. Pour le peptide $\text{A}\beta$, cette structure β -plissée compose la majorité des fibrilles amyloïdes (Giorgetti et al. 2018). Les brins d' $\text{A}\beta$ β -plissés s'assemblent en « épines amyloïdes » dans un sens parallèle ou anti-parallèle et leur juxtaposition forme des feuillets. L'ensemble des feuillets s'entrelace perpendiculairement donnant une meilleure stabilité et forme les plaques amyloïdes (H. Choi et al. 2017). Même si la majorité des plaques est constituée d' $\text{A}\beta_s$, plusieurs études démontrent la présence de molécules de la matrice extracellulaire (laminine, protéoglycans ; Brandan et

Inestrosa 1993; Mi et al. 2016), de lipides (céramides, cholestérol; Panchal et al. 2014), des protéines de sérum (albumine, C1q), d'ApoE/J et d'ions (Zn^{2+} , Cu^{2+}) dans les dépôts.

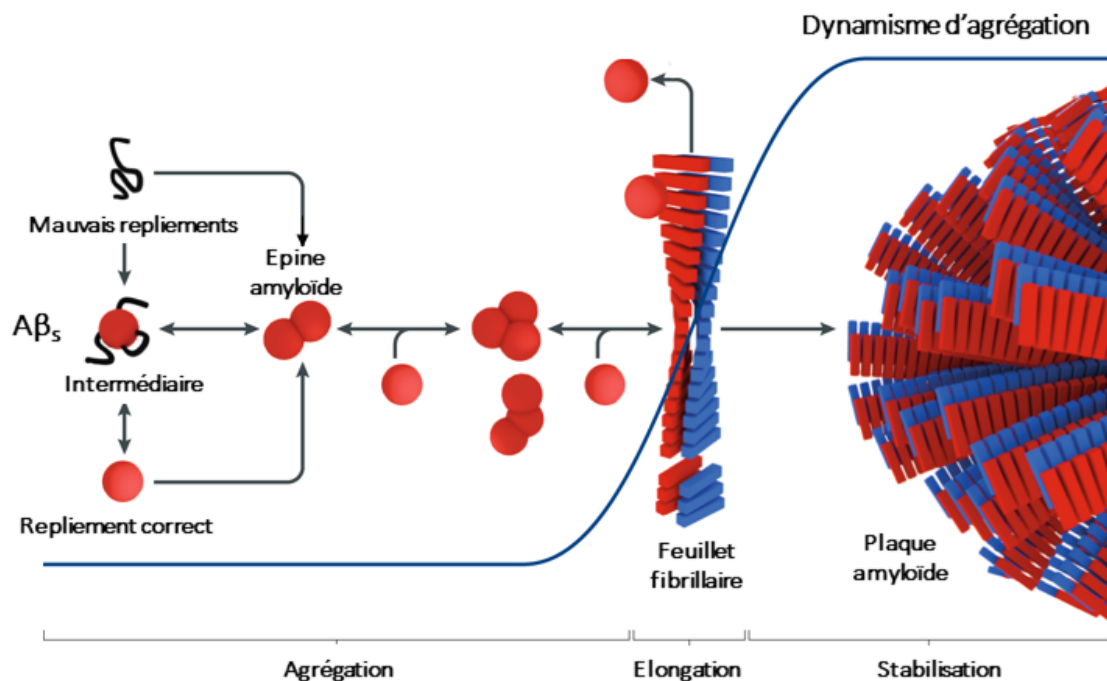


Figure 7: Formation de plaques séniles (Adapté d'après Iadanza et al. 2018)

Leur implication dans la morphologie et la toxicité des plaques reste encore à déterminer. L'immunomarquage du peptide Aβ dévoile diverses morphologies de plaques amyloïdes (Duyckaerts, Delatour, et Potier 2009) selon le stade de la pathologie, la localisation dans le cerveau et la présence ou non de neurites. Classiquement, nous pouvons distinguer deux catégories : les dépôts d'Aβ focaux et des dépôts d'Aβ diffus. Les dépôts focaux regroupent les plaques dites classiques ou neuritiques, immatures, compactes ou en laine de coton (détaillées dans la [Tableau 3](#)). Les caractéristiques de ces dépôts sont la densité (core dense, sphérique ou diffus), la composition en Aβ₄₀ et Aβ₄₂ et la présence ou l'absence de neurites. A l'inverse, les dépôts diffus sont des accumulations du peptide n'engendrant pas la maladie et présentant des contours irréguliers. Ces plaques amyloïdes sont nommées selon leur position : diffus dans le striatum et l'isocortex, « lake-like » (flaque) dans le présubiculum et « fleecy » (laineux ; Thal et al. 1999) dans le cortex entorhinal (Castellani s. d.; Greenfield's Neuropathology s. d.). Cependant, l'accumulation d'Aβ est aussi observée à l'intérieur des cellules neuronales et dans les vaisseaux sanguins par microscopie électronique ou immuno-marquage. A l'inverse d'un

traitement à l'acide formique pour permettre la visualisation d'A β agrégée en plaque, un traitement à la chaleur (amélioration de la visualisation de l'A β intracellulaire) montre qu'A β ₄₂ réside dans les corps multivésiculaires et est associé à la neuropathologie en s'accumulant dans les terminaisons nerveuses (Gouras, Almeida, et Takahashi 2005; Takahashi et al. 2002; Takahashi, Nagao, et Gouras 2017). L'angiopathie amyloïde cérébrale (CAA), quant à elle, se caractérise par une accumulation du peptide amyloïde dans les vaisseaux leptoméningés, sous-corticaux et corticaux. Les critères de Boston établissent la certitude d'avoir l'angiopathie en fonction de caractéristiques cliniques (hémorragie intracérébrale et/ou hémorragie sous-arachnoïdienne) et génétiques (mutation de l'APP ou PSEN1, allèle ApoE ϵ 2 et ϵ 4). Les hypothèses supposent qu'ApoE ϵ 4 accélère le dépôt amyloïde dans les artérioles cérébrales alors qu'ApoE ϵ 2 promeut la vasculopathie prédisposant à la rupture des vaisseaux. Cette lésion est connue pour être très fréquente dans les MA sporadiques (Weber, Patel, et Lutsep 2018).

Dépôts amyloïde	Caractéristiques A β	Neurites	Description	Images représentatives
Plaques neuritiques	<ul style="list-style-type: none"> Focales Core dense enrichit en Aβ40 Halo d'Aβ42 Couronne neuritique 	<ul style="list-style-type: none"> Présence (Dystrophie organelle, APP, ub et Tau) 	<ul style="list-style-type: none"> Plaque caractéristique de la MA 	
Plaques primitives ou immatures	<ul style="list-style-type: none"> Focales Dépôt sphérique d'Aβ42 	<ul style="list-style-type: none"> Absence 	<ul style="list-style-type: none"> Naissance de plaque, présente dans le striatum et chez les patients non-déments 	
Plaques compactes	<ul style="list-style-type: none"> Focales Core dense enrichit en Aβ40 	<ul style="list-style-type: none"> Présence faible (APP, ub) 	<ul style="list-style-type: none"> Localisation dans la couche des cellules de Purkinje dans le cervelet 	
Plaques « Cotton-wool » (en laine)	<ul style="list-style-type: none"> Focales Structure non-compacte avec une prédominance Aβ42 	<ul style="list-style-type: none"> Présence variable de Tau 	<ul style="list-style-type: none"> Décrit dans les FAD (PSEN1) 	
Plaques Diffuses	<ul style="list-style-type: none"> Diffus Contours irréguliers Forme sphérique 	<ul style="list-style-type: none"> Absence 	<ul style="list-style-type: none"> Dans le cortex et système limbique 	
Plaques « Fleecy » ou « lake-like »	<ul style="list-style-type: none"> Diffus Riches en Aβ42 et en Aβ tronqué 	<ul style="list-style-type: none"> Absence 	<ul style="list-style-type: none"> Dans les cortex entorhinal ou présubiculum et associée avec l'angiopathie 	

Tableau 3: Descriptions des différentes plaques séniles (Adapté d'après Greenfield's Neuropathology s. d.)

2. Dégénérescences neuro-fibrillaires

La deuxième lésion positive correspond à une accumulation de la protéine Tau (Takashima, Wolozin, et Buee 2019), impliquée dans les enchevêtrements neurofibrillaires, les neuropiles (Heiko Braak et al. 1986) et les plaques neuritiques (Iqbal, Liu, et Gong 2016; Serrano-Pozo et al. 2011). Même si le terme est une erreur d'interprétation, cette protéine s'accumule principalement en intracellulaire via une phosphorylation anormale ou une hyperphosphorylation et aboutit à l'agrégation et à la dégénérescence neurofibrillaire (DNF). Tau n'est pas spécifique à la MA, des DNF sont retrouvées dans la maladie de Parkinson ou maladie de Pick mais leur topographie au cours de l'évolution de la pathologie reflète les déficits cérébraux. La protéine Tau présente 6 isoformes appartenant à la famille des 3R ou 4R (nombre de segments répétés). Ces séquences en C-terminales sont responsables physiologiquement de la stabilité des microtubules mais dans la pathologie, ces domaines sont impliqués dans la

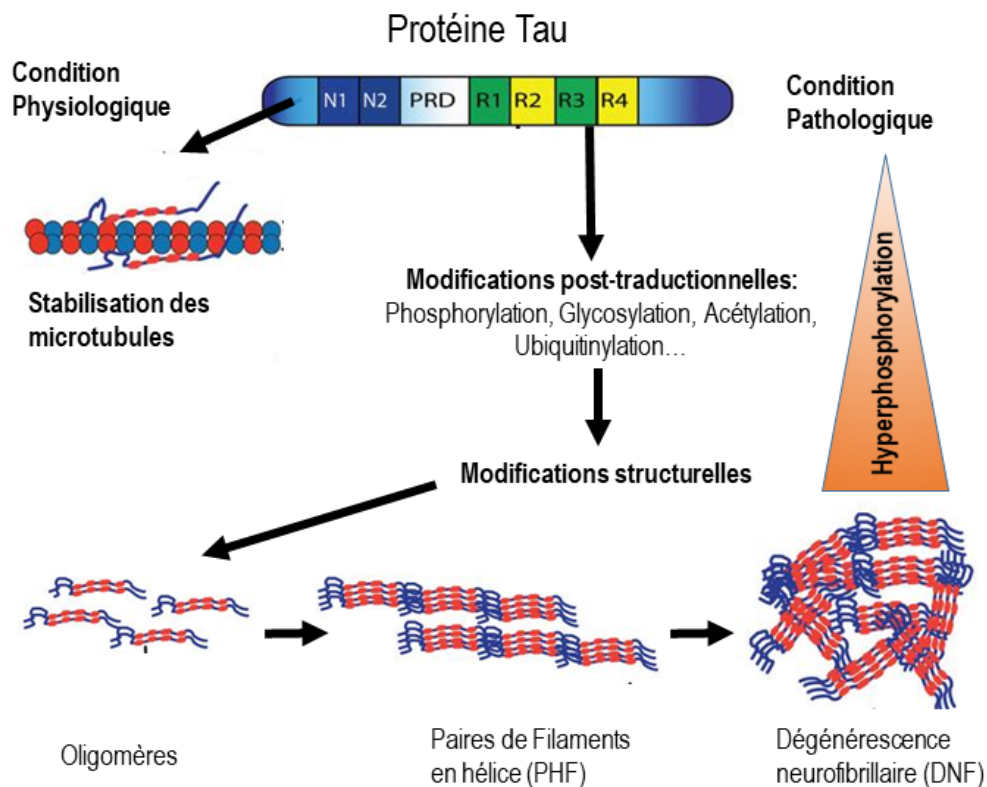


Figure 8 : Illustration schématique des modifications de la protéine Tau entraînant la formation des enchevêtrements neurofibrillaires. (Adapté d'après Almansoub et al. 2019)

fibrillogénèse de Tau. Les modifications post-traductionnelles et son agrégation sont en partie la conséquence d'un déséquilibre de certaines kinases et d'une interaction avec les plaques A β .

Une récente étude montre principalement une augmentation de la phosphorylation des sites Sérines, Ser199, et Thréonines, Tyr18 et 231, dans l'ensemble du cortex et en fonction du stade de Braak (Neddens et al. 2018). Cette hyperphosphorylation est causée surtout par la voie PI3K/AKT/GSK-3 β ou par CDK-5 (Shukla, Skuntz, et Pant 2012). Par ailleurs, d'autres modifications post-traductionnelles (Figure 8), telles que l'acétylation de la lysine 280 ou l'ubiquitinylation, ont un impact sur la conformation et la toxicité de Tau (Y. Gao et al. 2018). Ces changements affectent la plasticité synaptique dans les neuropiles et sa dégradation par le système protéasome. En ce qui concerne l'agrégation, la cryo-EM a mis en évidence que les régions R1, R3 et R4 comportaient des brins β permettant des liaisons et donnant une structure en forme « d'arc » aux protofilaments (Takashima, Wolozin, et Buee 2019). Son changement de conformation est un facteur de ce phénomène mais plus récemment, plusieurs chercheurs évoquent une interaction entre le peptide A β et Tau, et faciliterait la conversion de Tau ainsi que la formation d'agrégats de Tau dans les plaques neuritiques (Z. He et al. 2018 ; Li et al. 2016).

3. Inflammation, Astroglie et Neurodégénérescence.

En dehors des enchevêtrements neurofibrillaires et d'A β , des décennies de recherches ont mis aussi en évidence une perte neuronale et synaptique au cours de la pathologie ainsi que la présence d'une réponse inflammatoire issue des cellules microgliales et astrocytaires, impliquant de multiples dysfonctions cellulaires (ex : mitochondriales et autophagiques). Dans la MA, la protéine Tau et les catabolites de la β APP dont A β s'accumulent et s'agrègent dans les différentes cellules cérébrales (Figure 9) et interagissent avec des protéines constituant divers organites (Reddy et Oliver 2019a). Dans le cas de la mitochondrie (Albensi 2019), les dysfonctions apparaissent précocement dans la MA. De nombreuses études montrent, en outre, une importation du peptide amyloïde via les translocases Tom20 et Tim23, suivie d'une interaction entre A β ou Tau-P et DRP1, mPTP, ABAD ou le complexe 4 de la chaîne respiratoire. Ces phénomènes induisent des altérations du dynamisme mitochondrial avec une augmentation de la fission et une diminution de la fusion, des altérations des gènes mitochondriaux, de la mitophagie et de la morphologie de cette organelle (Albensi 2019). De même, il a été rapporté la présence d'une surproduction de radicaux libres et de peroxydation des lipides et une diminution de la production d'ATP et d'activité COX. L'émergence d'un stress oxydatif chronique et de la glycolyse aérobie serait en lien avec le développement de la

pathologie (Blanch et al. 2016 ; Hroudová, Singh, et Fišar 2014 ; Song et al. 2015; Swerdlow 2018).

Le deuxième mécanisme cellulaire impacté par la MA est l'autophagie. Ce processus physiologique permet de maintenir un équilibre au sein d'une cellule par dégradation. Une protéine ou un organite déficient (hors mitochondrie) initie un cycle autophagique dit non sélectif, pouvant impliquer la macro-autophagie (via les protéines ATG), l'autophagie médiée par un motif spécifique reconnu par les CMA (protéine chaperonne de l'autophagie) ou la micro-autophagie (Zare-shahabadi et al. 2015a). Dans la MA, il est clairement démontré que les dysfonctions de la voie lysosomiale autophagique précèdent les marqueurs histopathologiques et sont une des explications à la formation des plaques séniles et aux dégénérescences neurofibrillaires. L'ensemble des études se focalise de manière prédominante sur la voie macro-autophagique. En effet, les voies indépendantes ou dépendantes de mTor sont composées de multiples protéines ayant une relation étroite avec Tau ou les catabolites de la β APP dont $A\beta$. Par exemple, dans le cerveau des patients à des stades précoces il a été constaté une diminution de la Bécclin-1. Ce déficit joue sur l'accumulation du peptide $A\beta$ ainsi que sur d'autres catabolites de la β APP (Uddin et al. 2018) et sur la régulation de la voie AMPK dépendante de la protéine Akt. Bien sûr ce n'est pas la seule touchée, diverses protéines impactées jouent sur la modulation de la macro-autophagie (Figure 9) et la clairance des protéines telles que la préséniline, BACE1, TFEB mais aussi les miRNAs ciblant la voie AMPK, mTOR (Kuang et al. 2020).

Ces perturbations moléculaires, présentes à la fois dans les cellules neuronales et gliales, déclenchent un désordre global amenant à la pathologie. La plus grande partie des cellules composant le cerveau sont les astrocytes et les microglies. Physiologiquement, les microglies (Hansen, Hanson, et Sheng 2018) surveillent l'environnement contre l'ensemble des pathogènes ou des molécules « non soi » pouvant interférer avec l'équilibre du cerveau. L'âge, facteur de risque important pour la MA, bouleverse l'expression des marqueurs associés à la phagocytose avec une augmentation de CD11 ou CD14 ainsi que l'expression des marqueurs de l'homéostasie microgliale avec une baisse de CX3CR1. De plus, biochimiquement et morphologiquement les microglies deviennent réactives avec une forme dite amiboïde et sécrètent des ROS et des cytokines. L'hypothèse suggérant l'impact délétère des cellules microgliales dans la MA (Heppner, Ransohoff, et Becher 2015) correspondrait à une surstimulation des signaux liés à l'immunité via l'accumulation des catabolites de la β APP et la perte de la perméabilité de la BHE (Barrière Hémato-Encéphalique). La concentration et la

chronicité de ces divers stimuli entraîneraient des défaillances phagocytaires et inflammatoires. En effet dans des modèles murins âgés « Alzheimerisés », les cellules microgliales partiellement sénescents montrent une corrélation inverse, comparées à des cellules jeunes (Daria et al. 2017), avec une diminution des récepteurs capturant A β tels que RAGE, CD36, TREM2 ou SRA et une augmentation des cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL1- β). A contrario, dans des modèles cellulaires ou *in vivo*, la surexpression des récepteurs « scavengers », la délétion des cytokines pro-inflammatoires ou la stimulation des cytokines anti-inflammatoires (LXA, EP4) permettent de créer un environnement favorable à la dégradation d'A β par phagocytose, à la diminution des déficits cognitifs et de la perte neuronale et à la transmission synaptique (Newcombe et al. 2018).

Quant aux astrocytes (Osborn et al. 2016) longtemps considérées comme passives, elles endossent de multiples fonctions essentielles au bon fonctionnement du système nerveux central : le neuro-développement, la transmission synaptique, le maintien de la BHE et le métabolisme énergétique. Durant l'embryogénèse, les astrocytes instaurent les synapses excitatrices et procèdent à l'élimination des synapses glutamatergiques et gabaergiques durant la période prénatale. Par la suite, les cellules astrocytaires contrôlent et modulent la transmission et la plasticité synaptiques (Perez-Nievas 2019). Une architecture, bien définie, en « carrelage » (tiling) donne la faculté à ces cellules de s'associer avec 300 à 600 dendrites neuronales. Leur capacité de modulation vient de la capture du glutamate via les transporteurs GLT-1 ou GLAST et de la transformation de ce substrat en glutamine. Pour le métabolisme énergétique, les astrocytes assimilent le glucose via le transporteur GLT-1 en provenance des vaisseaux sanguins. Le stockage en glycogène empêche la glycolyse aérobie et le transfert du lactate au neurone, donne l'énergie suffisante pour la libération des neurotransmetteurs. Dans le cas de la BHE, les pieds astrocytaires s'associent avec les péricytes, la membrane basale et les cellules endothéliales pour coordonner le flux sanguin via les aquaporines. Dans la MA, les stimuli (A β) rendent les astrocytes réactives et sont caractérisées par une hypertrophie. Parallèlement, une surexpression des protéines du filament intermédiaire est présente : GFAP, vimentine, nestine et synémine. L'ensemble des fonctions physiologiques (Perez-Nievas 2019), décrites préalablement, sont toutes affectées et une sécrétion de molécules pro-inflammatoires procure une relation étroite avec les cellules microgliales, entraînant un environnement neurotoxique. De manière générale et dans un premier temps, les astrocytes réactives ont un effet neuro-protecteur car une déplétion de la GFAP induit une augmentation du nombre de plaques neuritiques. Mais d'un autre côté, des études montrent des dysfonctions synaptiques et de l'angiopathie cérébrale, en partie à cause d'un détachement des pieds astrocytaires, du flux

calcique et d'une diminution de l'expression de GLT-1 et de la glutamine synthétase (Garcia-Esparcia et al. 2018, 1). De plus, une altération de la production du cholestérol et d'ApoE venant des astrocytes favorise la présence de céramide, sphingolipide responsable de la production d'A β et de la modification de la membrane plasmique (induisant une libération accrue d'exosomes et de cytokines inflammatoires) et la mort neuronale (Newcombe et al. 2018).

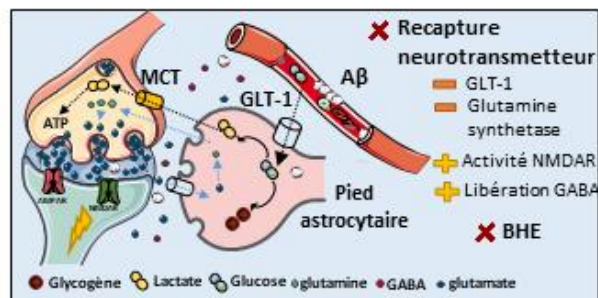
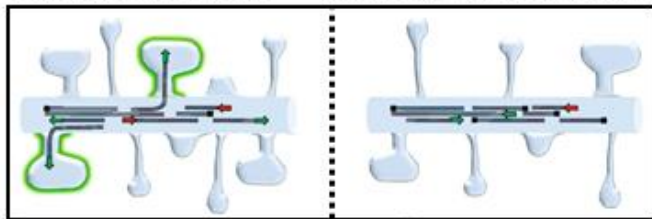
L'ensemble des dysfonctions moléculaires ainsi que l'ensemble des dérégulations propres à chacune des cellules gliales aboutissent à une perte synaptique en diminuant la densité et en modifiant la morphologie des épines dendritiques (Cuestas Torres et Cardenas 2020; Dorostkar et al. 2015 ; Herms et Dorostkar 2016 ; Rajendran et Paolicelli 2018). L'ensemble des études stipule que le peptide A β ou Tau, de manière directe ou indirecte, altère l'arborisation des épines dendritiques, c'est à dire la plasticité synaptique avec une modification protéique de la membrane des épines telle qu'une baisse des récepteurs ou canaux neuroexcitateurs (NMDAR, AMPAR ou mGluR1) et avec une altération du dynamisme et de la stabilité des filaments d'actines formant les boutons synaptiques (Smith et al. 2009).

Figure 9: Lésions moléculaires impliquées dans l'initiation et l'aggravation de la maladie d'Alzheimer. 1 – Dérégulation du fonctionnement mitochondrial avec entre autre une altération de l'autophagie sélective via une liaison de DRP1 avec A β . 2- Altération de la voie autophagique avec une perturbation sur l'initiation, la maturation des phagosomes, la fusion et la dégradation. 3 ; 5- Dysfonctions de la transmission synaptique avec un défaut de l'arborisation des épines dendritiques et de la recapture des neurotransmetteurs via les astrocytes. 4 ; 6- lésions positives par une accumulation de la protéine Tau et A β . 7- Réponses et sécrétions de molécules pro-inflammatoires par les microglies et astrocytes aux différents stimuli. 8- Propagation de la pathologie Tau et des catabolites de la β APP via la voie exosomale.

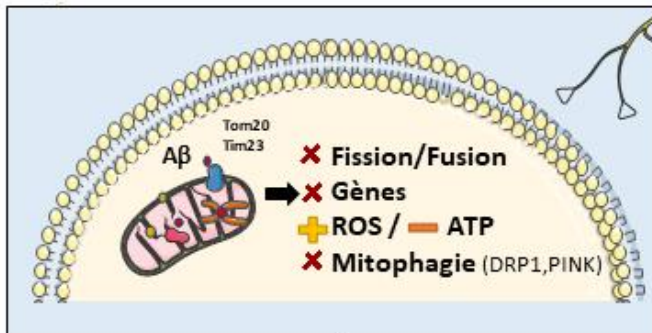
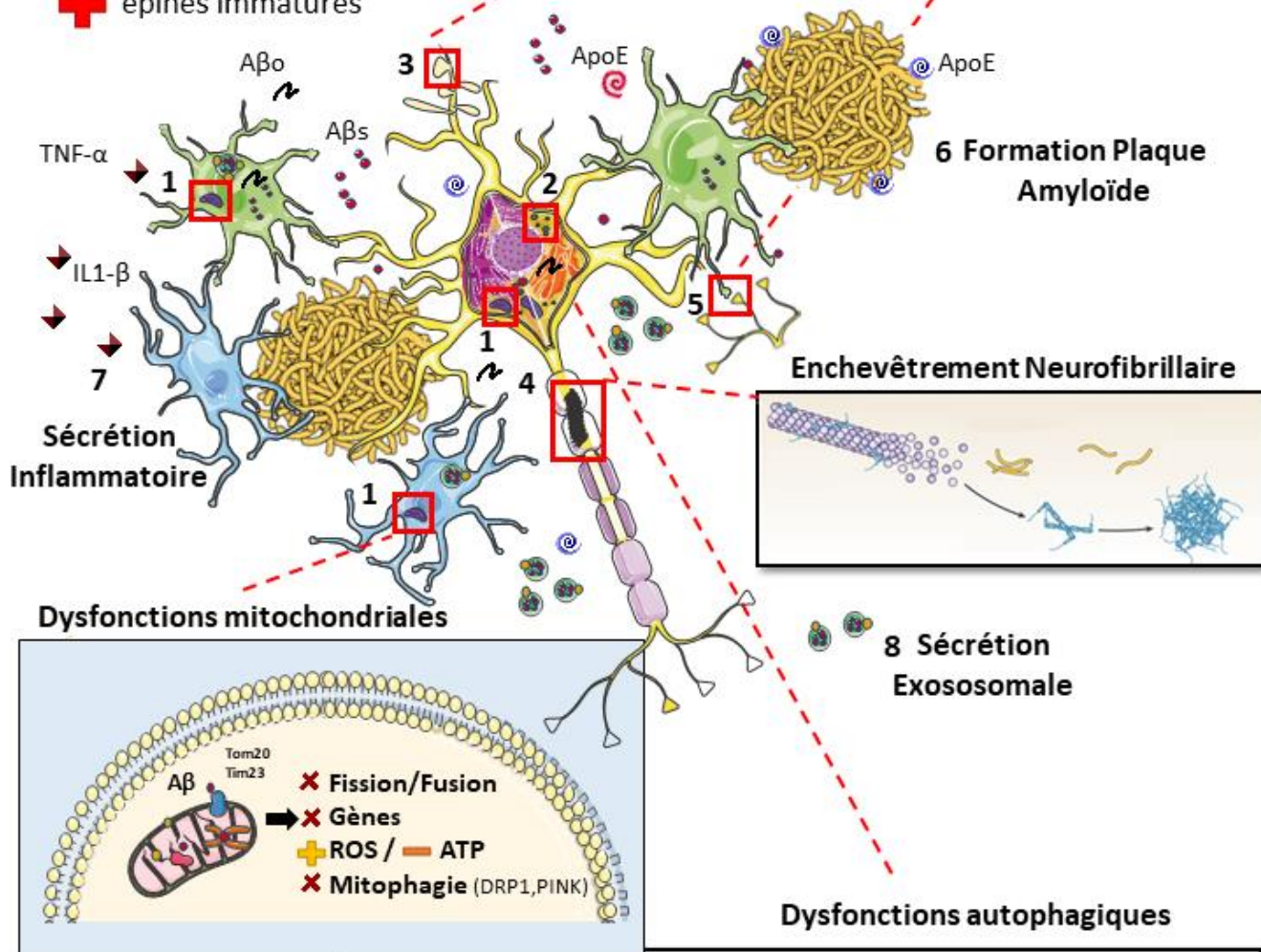
Dysfonctions de la transmission synaptique

Condition Normale

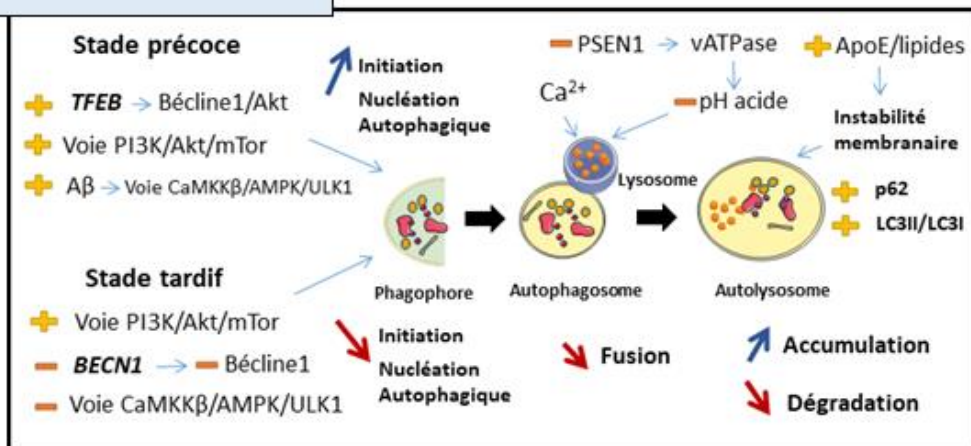
Condition Pathologique



— densité épines
+ épines immatures



Dysfonctions autophagiques



A. Maturation protéolytique de la β APP

1. Fonctions et localisation cellulaire de la β APP

L'APP (Amyloid- β protein precursor), appelée aussi β APP, est une protéine transmembranaire de type 1 qui est conservée dans de très nombreuses espèces telles que le zebrafish ou le c.elegans. L'apparition des membres de la famille β APP (Figure 10) coïncide avec l'évolution de système nerveux central ainsi que les fonctions des synapses (Shariati et De Strooper 2013).

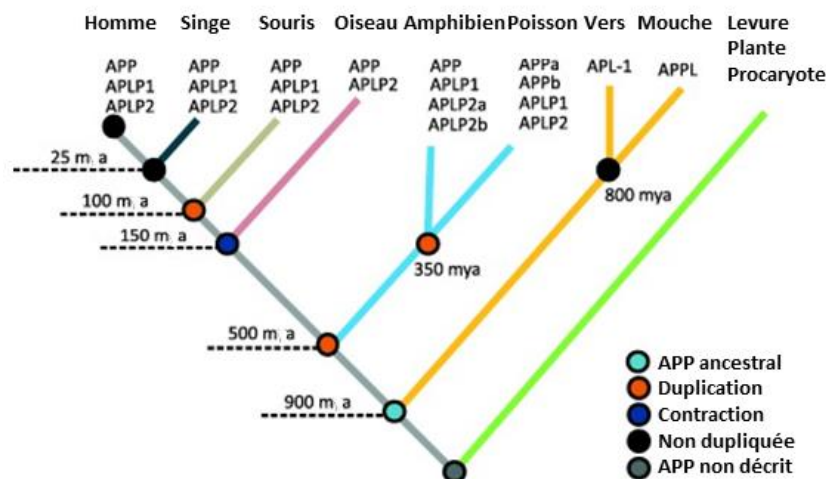


Figure 10: Phylogénie des membres de la famille APP illustrant les évènements importants au cours de l'évolution d'après Shariati et al, 2013. (ma : million d'années)

Dans le cas de l'être humain, le clonage et l'évolution technologique ont permis l'identification de trois gènes (Figure 11) codant pour les protéines β APP (chr 21q11.2-21), APLP1 (chr 19q13.12) et APLP2 (chr 11q24.3). Le gène *APP* (Dawkins et Small 2014) contient 18 exons et son épissage alternatif permet la formation de 8 isoformes de cette protéine. APP695 est un isoforme prédominant dans les neurones et ne comporte pas d'exons 7 et 8. Les deux autres isoformes exprimés de manière ubiquitaire sont APP751 et APP770. La β APP présente et partage avec APLP1 et APLP2 un large domaine extracellulaire N-terminal composé de deux

domaines : E1 et E2 ainsi qu'une région carboxyl-terminale (Figure 11). Cependant, la protéine β APP est la seule à être composée de la séquence A β . L'ensemble de ces domaines et les motifs reliés lui procurent ses caractéristiques fonctionnelles et son trafic cellulaire. Même si plusieurs fonctions de cette protéine restent toujours incertaines, de nombreuses équipes ont mis en évidence que la β APP est impliquée dans la fonction mitochondriale, dans la neuritogénèse, la migration neuronale, la régénération axonale, l'adhésion cellulaire, la vasoconstriction aortique et la synaptogénèse (Sosa et al. 2017). Pour identifier ces fonctions,

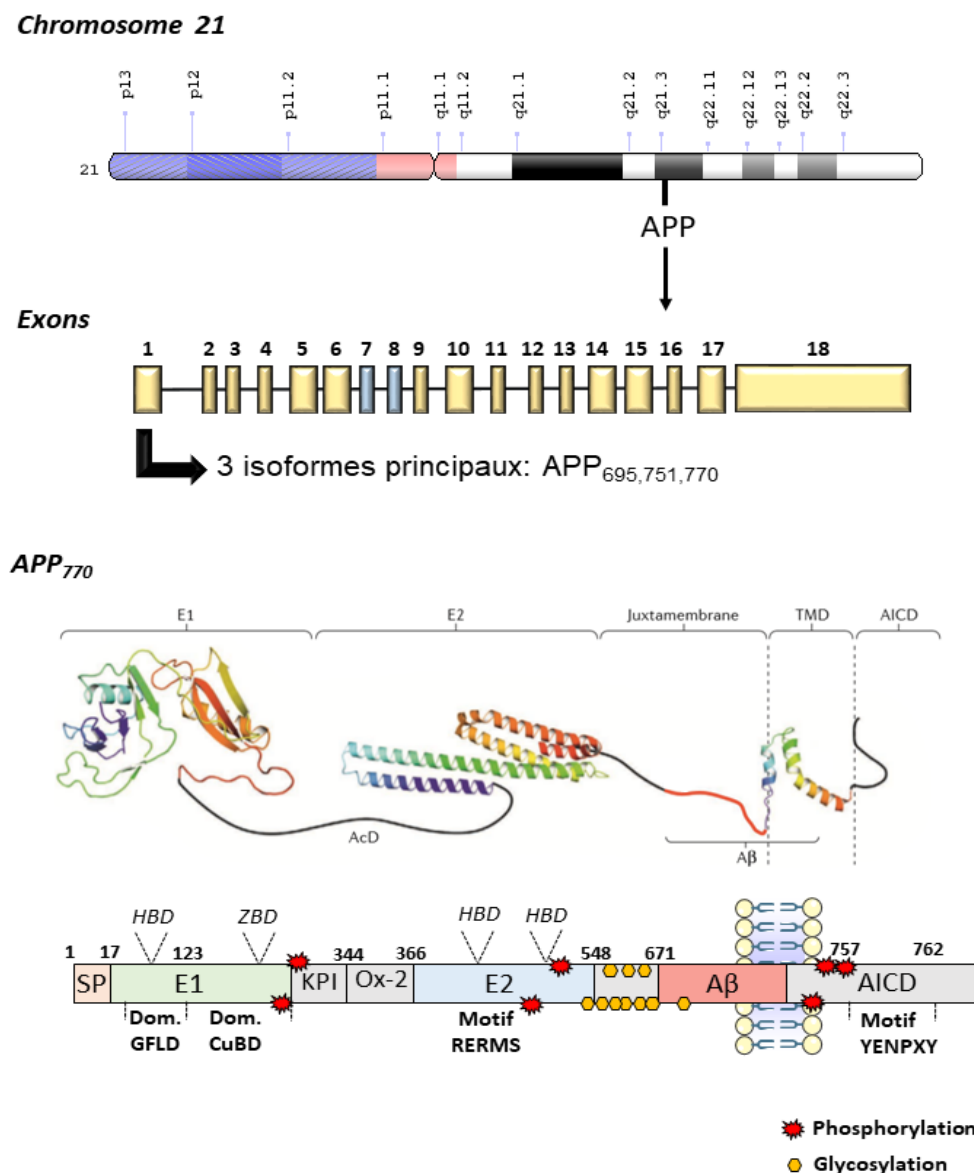


Figure 11 : Schéma de la traduction de la β APP et de ces modifications post-traductionnelles. (Inspirée de Dawkins et Small 2014; Müller, Deller, et Korte 2017; HBD : heparin binding ; ZBD : Zinc binding)

les premières expériences ont été d'effectuer une invalidation de cette protéine dans des souris (van der Kant et Goldstein 2015). Une souris KO β APP est infertile mais cette invalidation n'est pas létale. De nombreux déficits neurologiques sont tout de même à déplorer: préhension, locomotion, densité des épines dendritiques, volume cérébral et mémoire (Dawson et al. 1999). Dans ces conditions, un système de compensation a été observé avec une augmentation de l'expression d'APLP1 et d'APLP2. Pour éliminer ce biais, plusieurs équipes ont donc créé des souris double KO pour APP et APLP2, APLP1 et APLP2 et des souris triples KO APP, APLP1 et APLP2. Ces mutations sont quant à elles létales et indiquent qu'APLP2 a un rôle pivot, pouvant compenser la perte de fonction des protéines β APP et APLP1. Dans les souris KO APP/APLP2, il a été observé des défauts sur la formation des jonctions neuromusculaires et sur la densité de vésicules et la transmission synaptique (H. Y. Choi 2013; Guo et al. 2012 ; P. Wang 2005).

La protéine β APP présente une structure similaire avec les récepteurs de surface cellulaire tels que Notch et DDC (Deyts, Thinakaran, et Parent 2016). Cette particularité a dirigé les scientifiques à identifier des molécules interagissant avec β APP par spectrométrie de masse (Bai et al. 2008), test de liaison (Reinhard et al. 2013) ou co-immunoprécipitation (Hoe et al. 2009). La dimérisation de la β APP en cis ou en trans avec ses diverses partenaires ou les modifications post-traductionnelles lui confèrent ses propriétés et s'auto-régulent via de multiples moyens. La palmitoylation de la β APP, par exemple, lui permet son insertion dans les rafts lipidiques et favorise le clivage par la β -sécrétase. Dans le cas d'un individu sain, seulement 10% de la β APP subit cette modification (Bhattacharyya, Barren, et Kovacs 2013). D'autres études démontrent que sa liaison avec le récepteur androgène (Takayama, Fujiwara, et Inoue 2019) ou avec la protéine PAT1 (Dilsizoglu Senol et al. 2019) jouerait sur son niveau d'expression et son endocytose.

Dans la partie extra-cellulaire, plus précisément les sites de liaisons aux héparines ou aux métaux aident à l'interaction entre la protéine β APP et la matrice extracellulaire (MEC; Dityatev, Seidenbecher, et Schachner 2010; Mouw, Ou, et Weaver 2014; Sosa et al. 2017). Le domaine E2 détient un motif RERMS (Figure 11) qui promeut l'extension des neurites via sa liaison avec les protéoglycans au niveau de la membrane plasmique (Jin et al. 1994 ; Reinhard et al. 2013). En deuxième exemple la Reelin (Hoe et al. 2009), protéine exprimée dans les cellules Cajal-Retzius durant la phase embryonnaire, régule la migration neuronale via la phosphorylation de la molécule adaptatrice Dab-1. Cette étude met en évidence l'interaction moléculaire entre la Reelin (le domaine E1), la $\alpha 3/\beta 1$ intégrine et la β APP et témoigne son rôle

dans l'arborisation dendritique et l'excroissance neuritique. Ces liaisons avec la MEC, telles que les protéoglycans, la F-spondin (Ho et Sudhof 2004), la laminine (Sosa et al. 2013), les intégrines (Tracy L Young-Pearse et al. 2008) ou la Reelin, régulent le pourcentage de la protéine β APP à la surface cellulaire en inhibant son endocytose et en évitant sa présence dans les endosomes. Cela limite la voie amyloïdogène et la formation des catabolites toxiques de la β APP, processus de trafic cellulaire dérégulé dans le cas de la MA (Nixon 2017; Yuksel et Tacal 2019).

Dans la partie intra-cellulaire, la β APP interagit avec des molécules adaptatrices en se liant sur le motif YENPTY (Figure 11). Une mutation sur ce motif inhibe l'internalisation de la protéine β APP et diminue donc la formation des catabolites générée par la voie amyloïdogène. Ces multiples adaptateurs contribuent aux fonctions de guidage axonal (Rama et al. 2012), à la neuroprotection ou la migration cellulaire (tel que Dab-1 ou GSK-3 β , Milosch et al. 2014 ; T. L. Young-Pearse et al. 2007) mais surtout ces protéines gèrent la phosphorylation et la déphosphorylation de la Thr-668 et Tyr 682. Ce mécanisme permet de contrôler les protéines adaptatrices pouvant se lier à la protéine β APP et la fonction qui peut émerger. Des souris transgéniques avec une délétion sur Mints révèlent une diminution de la production d'A β s et de plaques séniles (Ho, Liu, et Sudhof 2008). Dans le cas de Fe65, cette protéine est impliquée dans la migration mais interagit avec AICD (développé dans la partie « AICD ») pour pouvoir le transloquer dans le noyau et transactiver les gènes dépendant de Fe65 (Nakaya et Suzuki 2006; Sumioka et al. 2005).

Même si on observe un rôle non négligeable des ligands de la β APP, on peut aussi noter que la présence de cette protéine dans les différents compartiments cellulaires a un impact important sur ses fonctions et son clivage (Haass et al. 2012 ; Thinakaran et Koo 2008). Après sa synthèse dans le réticulum endoplasmique (RE), la β APP immature est alors transportée dans le réseau trans-golgien pour subir des modifications post-traductionnelles : glycosylation et phosphorylation (Figure 11). Par la suite, cette protéine est reconnue par des molécules adaptatrices en se fixant sur les motifs situés en région C-terminal (Perez et al. 1999). La β APP s'accumule dans des vésicules de clathrine, entre autre, via les complexes AP (Burgos et al. 2010) ou dans des structures tubulaires composées de kinésine pour être ensuite acheminé dans différentes régions cellulaires : membrane plasmique, dendrites, axones et mitochondries. Dans la MA, le trafic cellulaire de l' β APP est lourdement perturbé par une augmentation du clivage amyloïdogène (décrit ultérieurement) et une modification de la composition lipidique des membranes (Cossec et al. 2010).

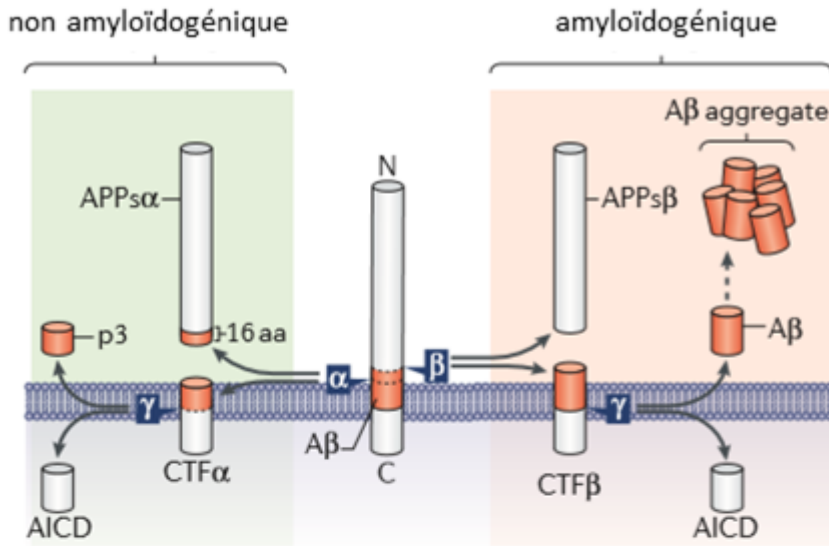
Dans la mitochondrie (Lopez Sanchez, Wijngaarden, et Trounce 2019), des études témoignent de l'association de la β APP avec les protéines de translocation Tom40 et Tim23. Cette interaction empêche l'import de protéines mitochondriales telles que les sous-unités OSPHOS (protéines de la chaîne respiratoire) et engendre des dysfonctions. Une surexpression de la β APP wt altère la respiration mitochondriale et corrèle avec la réduction de la transcription de l'ADN mitochondrial. Par ailleurs les MAMs (membranes du RE associées aux mitochondries), représentant un rôle clé dans l'homéostasie des mitochondries, sont un site intracellulaire de la protéolyse de la β APP. Dans la MA, les catabolites générés déstabilisent le contact RE-mitochondrie et perturbent l'homéostasie lipidique engendrant des modifications du trafic de la β APP (Wilkins et Swerdlow 2017). Dans les fentes synaptiques (Tang 2019), β APP régule la transmission Gabaergique en jouant sur l'activité des co-transporteurs Chlorure-Potassium (KCC2/SLC12A5) ou en se liant avec le domaine sushi du récepteur métabotropique GABA_B (Dinamarca et al. 2019 ; Rice et al. 2019). La β APP surexprimée jouerait sur l'expression d'USF1, molécule régulant KCC2. A l'inverse, un déficit de la β APP provoquerait une augmentation de la phosphorylation de la tyrosine KCC2. Par conséquent, les neurones Gabaergiques ont un déséquilibre Cl⁻ intracellulaire et une inhibition de la transmission synaptique (Chen et al. 2017 ; Doshina et al. 2017).

Comme j'ai pu l'écrire à plusieurs reprises, cette protéine peut être clivée par de multiples voies protéolytiques (Figure 12). Les voies dites canoniques, regroupant la voie non amyloïdogène et amyloïdogène et les voies dites non canoniques, réunissant la voie δ sécrétase, la voie Meprin- β , la voie η -sécrétase et la voie caspase. Ces protéolyses libèrent divers fragments dont certains sont proposés comme initiateur ou fortement impliqués dans l'initiation et l'aggravation de la MA (Müller, Deller, et Korte 2017). Les enzymes α , β et γ -sécrétases représentent la source majeure des catabolites toxiques (décrit ultérieurement). Cependant, les voies non canoniques génèrent aussi des fragments pathogènes montrant leur rôle pivot dans la MA. La voie δ sécrétase (Z. Zhang, Tian, et Ye 2020) est impliquée dans la production du peptide A β avec le clivage de la protéine β APP en N585 et N373 (Z. Zhang et al. 2015), dans la pathologie Tau par le clivage en position N368 (Z. Zhang et al. 2018), dans le déséquilibre entre Tau-4R et Tau-3R (Z.-H. Wang et al. 2018) et par son action sur la protéine SET, générant un fragment qui augmente l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau (Basurto-Islas et al. 2013). La découverte de la voie Meprin- β en 2011 démontrait une implication non toxique des fragments générés par cette enzyme (Jefferson et al. 2011). Cependant des études récentes prouvent que la Meprin β diminue la génération des fragments APP α en favorisant C99 et des

formes N-tronquée d'A β s (Becker-Pauly et Pietrzik 2017; Scharfenberg et al. 2019 ; Schönherr et al. 2016). Plus précisément, une phosphorylation sur la sérine 675 de la β APP favoriserait le clivage par la Meprin β et non par l' α -sécrétase (Menon et al. 2019). En ce qui concerne la voie des caspases (Nhan, Chiang, et Koo 2015), elle produit deux fragments : Jcasp et C31. Jcasp, peptide de 2.8 kDa, rapporte des activités pro-apoptotiques, cependant son rôle dans la MA est encore lourdement controversé. A l'inverse C31 semble avoir un rôle mieux caractérisé. Cette protéine semble induire la mort cellulaire et être dépendante de la β APP (Galvan et al. 2006 ; Lu et al. 2000).

Figure 12: Schéma des voies protéolytiques de la protéine β APP d'après Müller (Müller, Deller, et Korte 2017). (a) Processus canonique avec les voies principales du clivage de la β APP, la voie amyloïdogénique sur fond vert et la voie non amyloïdogénique sur fond rouge. Libération des fragments APP α , APP β , C99, C83, A β s, p3 et AICD via les sécrétases (α , β et γ). (b) Processus avec les voies non canoniques : Voies δ , η -sécrétases, meprin β et caspases. Les sites de clivages de ces enzymes permettent la production de multiples catabolites de la région N et C-terminale de la protéine APP₆₉₅. ADAM, disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10 ; APH1, anterior pharynx defective 1; NCT, nicastrin; PEN2, presenilin enhancer 2; PS1, presenilin 1; AEP: asparagine endopeptidase; MT-MMP : Membrane-type matrix metalloproteinase .

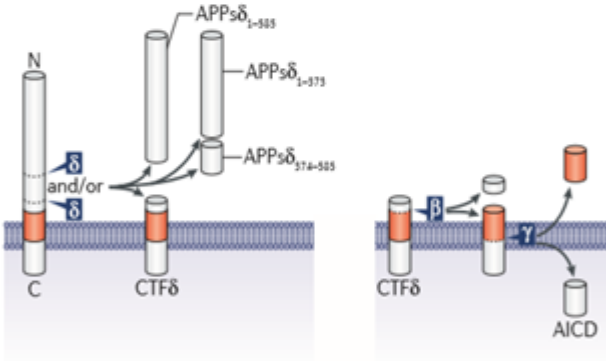
Processus canonique (a)



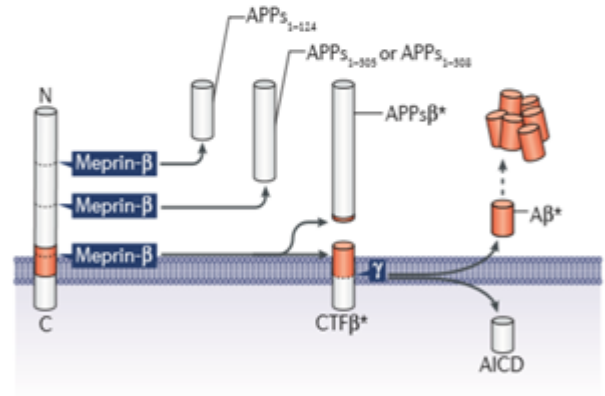
Les sécrétases:
 α-sécrétase: ADAM 9, 10 et 17
 β-sécrétase: BACE 1 et BACE 2
 γ-sécrétase: complexe PS1/PS2, NCT, PEN2 et APH₅
 δ-sécrétase: AEP
 η-sécrétase: MT-MMPs

Processus non-canonique (b)

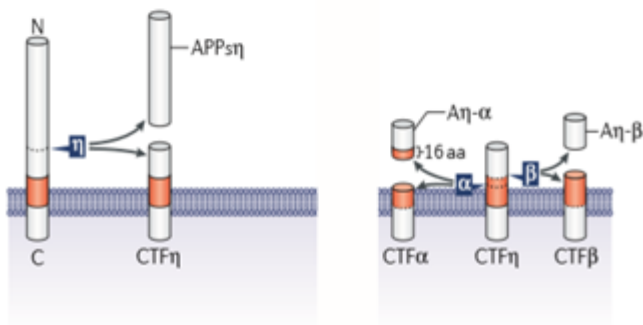
Voie δ-sécrétase



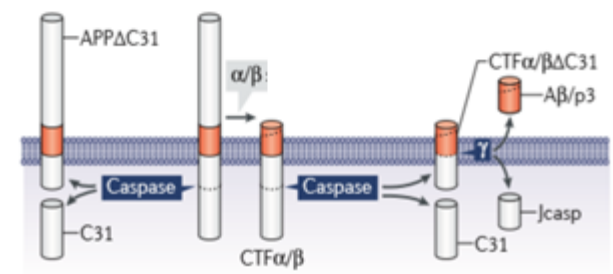
Voie Meprin β



Voie η-sécrétase



Voie caspase



2. Protéolyse non-amyloïdogénique

La voie non-amyloïdogénique (Expertise 2007) correspond à un des processus physiologiques du clivage de la protéine β APP dans une cellule. Cette protéolyse est le résultat de coupures successives de la β APP par l' α et la γ -sécrétase. Le clivage de l' α -sécrétase se situe au milieu de la membrane plasmique avec une coupure sur la séquence A β (Lys¹⁶-Leu¹⁷) formant les protéines sAPP α et C83 (décrit en détails en 4.a et 4.b). La production du C83 via l' α -sécrétase vient à la fois de la protéine β APP mais aussi de C99 (Flammang et al. 2012). L'activité α -sécrétase est exercée par une famille d'enzymes appelée ADAMs (A Disintegrin And Metalloproteinase) composée de 33 membres (Hsia et al. 2019). Ces enzymes sont fortement exprimées dans l'épididyme, les testicules et le cerveau, indiquant leur rôle important dans la fertilisation et dans l'équilibre de l'activité synaptique. Seulement ADAM 9, ADAM 10 et ADAM 17 ont une fonction α -sécrétase sur la β APP et conduisent soit à une sécrétion régulée via PKA ou PKC, soit à une sécrétion constitutive (F. Checler 1995). Cette superfamille de protéase à zinc est constituée d'un peptide signal en sa région N-terminale, de sites de clivage pour la pro-hormone convertase, d'un domaine catalytique et d'une région transmembranaire et cytoplasmique avec un site riche en cystéine. ADAM 9 (Cong et Jia 2011) est exprimé dans l'hippocampe et les cellules de Purkinje et des polymorphismes activatrices du promoteur ou des activations pharmacologiques, auraient des effets protecteurs contre la MA sporadique. ADAM 10 (Kuhn et al. 2010, 10 ; Yuan et al. 2017) est une protéase régulée et constitutive, avec des fonctions majeures dans le SNC telles que la neurogénèse, la formation des synapses, la myélinisation... Cette enzyme interagit avec plus de 90 substrats (Notch, N-cadhérine) mais en condition pathologique, une diminution de son activité dans des modèles murins transgéniques ou dans des neurones primaires mène à un excès du peptide A β . ADAM 17 (Gooz 2010) est quant à elle, une enzyme impliquée dans la voie non-amyloïdogénique et contrôlée par de multiples composés (esther de phorbol, récepteurs acétylcholines muscariniques ; Caccamo et al. 2006). Dans la maladie d'Alzheimer ADAM17 microgliale aurait cependant, des fonctions délétères en agissant sur TREM2 et TNF- α (Buxbaum et al. 1998) mais aussi sur de nombreuses molécules jouant sur la neuro-inflammation et la progression de la pathologie (AXL, CSF1R, LRP-1). Après l'action des ADAMs sur la β APP, le fragment C83 est à son tour clivé par la γ -sécrétase produisant le peptide de 3 kDa et le fragment intracellulaire, AICD.

3. Protéolyse amyloïdogénique

Depuis plus de 30 ans, l'étude du peptide amyloïde s'est largement tournée sur la compréhension de la pathogénèse de l'Alzheimer et des interventions thérapeutiques. Après le clonage de la protéine β APP (Kang et al. 1987), les études ont montré que la séquence du peptide $A\beta$ est localisée en partie sur le domaine trans-membranaire. Ce n'est qu'en 1999 que différentes équipes (Hussain et al. 1999; Riqiang Yan 2017) identifient l'aspartyl protéase ancrée à la membrane nommée la β -sécrétase ainsi que la γ -sécrétase (ensemble de protéines formant un complexe et décrit dans le 3(b)). Ces enzymes sont responsables en majorité de la formation du peptide $A\beta$ et participent à la voie dite amyloïdogène, décrite juste après.

(a) β -sécrétases

i. Structure et trafic cellulaire

Pour explorer et comprendre les fonctions de cette enzyme, plusieurs laboratoires ont étudié sa structure et sa localisation. Cette enzyme est une aspartyle protéase transmembranaire (TM) de type 1 avec diverses noms : BACE 1, β -sécrétase, memapsine-2, ASP2 ou EC 3.4.23.46 et partage une similarité à 59% avec BACE 2 (Sinha et al. 1999 ; Vassar et al. 2009). La β -sécrétase de 501 acides aminés est synthétisée dans le réticulum endoplasmique avec plusieurs domaines, lui conférant un repliement correct et un pouvoir catalytique, illustré dans la Figure 13 (Riqiang Yan 2017). Plusieurs molécules inhibant le domaine TM montrent l'importance de l'amarrage de cette enzyme à la membrane pour permettre son clivage sur la protéine β APP (R. Yan et al. 2001). Par la suite, BACE1 subit de multiples modifications post-traductionnelles (Tableau 4) telles que la N-glycosylation, l'acétylation, l'ubiquitinylation et la palmitoylation (Wang et al. 2012). Cette maturation lui permet de réguler sa propre dégradation et sa localisation cellulaire mais il faut noter que ces modifications ne sont pas nécessaires pour son activité protéolytique. Cette enzyme a une activité plus importante dans des compartiments ayant un environnement acide (Sharoar et Yan 2017) tels que les endosomes et sa présence avec ARF6, Rab11 ou la sortiline entraîne une augmentation significative de la production d' $A\beta$. BACE1 est aussi retrouvé dans les terminaisons présynaptiques et les axones des neurones, ce

qui facilite la présence du peptide amyloïde dans les terminaisons synaptiques et la formation des plaques séniles dans les patients MA (Sadleir et al. 2016).

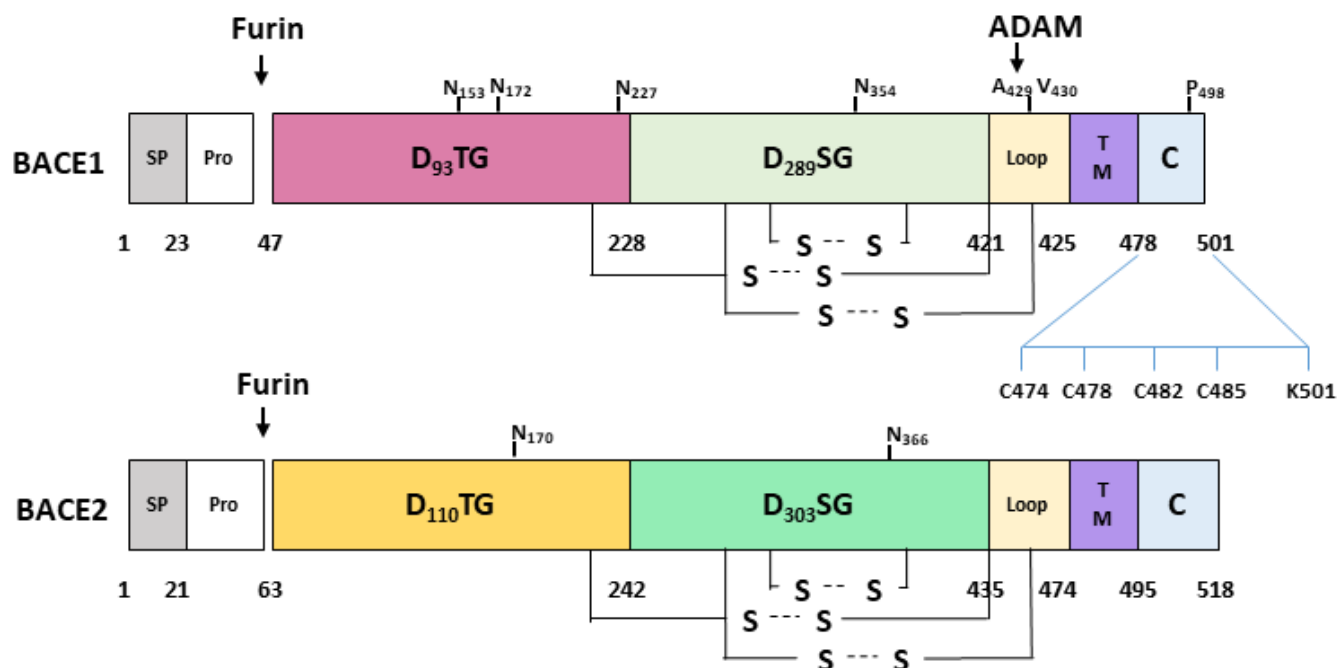


Figure 13: Schéma illustratif de l'organisation structurale de BACE1 et BACE2(d'après Riqiang Yan 2017)

Caractéristique	Position sur la séquence d'acide aminées	Fonctions
Propeptide	22-45	Repliement, amélioration de l'activité
Pont dissulfure	216-420,278-443,330-380	Stabilité structurale
Glycosylation	153,172,223,354	Ciblage lysosomiale, dégradation
Phosphorylation	498	Trafic lysosome-endosomal
Ubiquitination	501	Trafic, dégradation
S-Palmitoylation	474,478,483,485	raft lipidique, amyloïdogénèse
Lysine	126,275,279,285	Stabilité; passage du RE, amélioration de l'activité intra-cellulaire
Acetylation	399,300,307	

Tableau 4 : Modifications post-traductionnelles de BACE-1 d'après la revue (Koelsch 2017)

ii. Fonctions physiologiques et substrats

De nombreux articles montrent une contribution majeure de l'enzyme BACE1 dans les processus de « shedding » au niveau neuronal. En effet, des souris KO BACE 1^{-/-} présentent des symptômes de schizophrénie, d'hyperactivité, d'anxiété, de défaut du guidage axonal et d'une protection contre l'obésité induite par l'alimentation. Grâce à une technique de SPECS (Kuhn et al. 2012), plus d'une trentaine de substrats ont été découverts, dont 19% des protéines clivées par ADAM17. L'ensemble de ces substrats montrent que BACE1 a un rôle dans l'astrogenèse et la neurogénèse via la protéine Jag1, ligand des récepteurs Notch, important dans le développement précoce de l'hippocampe. En absence de BACE1, il a été observé une augmentation de l'astrogenèse et une diminution de la neurogenèse dans le gyrus dentelé de l'hippocampe (He et al. 2014 ; Hu et al. 2013). BACE1 montre aussi un rôle dans la myélinisation via la contactine 2 (Dislich et al. 2015 ; Kuhn et al. 2012) et la neuréguline. Le fragment N-terminal de la neuréguline (Nrg1 de type I ou III) se lie avec le récepteur ErbB pour permettre la re/myélinisation au niveau des cellules de Schwann ou du nerf optique. Trois autres rôles ont été décrits. BACE1 agit sur les sous-unités formant les canaux sodiques ou potassiques (KCNE1 ou 2, Sachse et al. 2013) créant des crises d'épilepsie, sur l'expression du facteur de transcription Egr3 via la Nrg contrôlant l'expression de gènes de formation des fibres musculaires (Cheret et al. 2013) et sur le clivage des protéines comme la β APP, SEZ6 ou la neurexine impliquées dans les dysfonctions des neurones glutamatergiques, gabaergiques et dopaminergiques, dans la croissance des neurites et dans la formation des synapses.

La protéase homologue pancréatique, BACE2, est présente majoritairement dans le côlon, le rein et le pancréas. BACE2 joue sur le contrôle des cellules bêta pancréatiques, le métabolisme du glucose et la pigmentation (PMEL et TMEM27, Shimshek et al. 2016; Voytyuk, De Strooper, et Chávez-Gutiérrez 2018). L'homéostasie du glucose dans l'organisme est maintenue par les cellules bêta en co-sécrétant l'insuline et les IAPP (islet amyloid polypeptide). Un déficit de BACE2 entraîne une augmentation d'homodimère IAPP et produit une toxicité d'oligomères et de fibrilles amyloïdes induisant un défaut de tolérance au glucose (Alcarraz-Vizán et al. 2017 ; Rulifson et al. 2016). Récemment, il a été observé la présence des ARNms de BACE 2 dans les neurones (Voytyuk, De Strooper, et Chávez-Gutiérrez 2018), oligodendrocytes et les astrocytes dans différentes aires du cerveau. Les chercheurs détectent un effet du traitement avec le CpJ (inhibiteurs de BACE 1 et 2) dans les cellules exprimant BACE1 ou doublement invalidées pour les protéines VCAM1 et DNER (+ de 30% de

réduction). Ces protéines sont responsables de l'infiltration des globules blancs dans les vaisseaux sanguins et médient la voie Notch ainsi que les interactions entre les neurones.

iii. Fonctions dans la formation des catabolites β APP : coupures β et β'

Dans le contexte de la MA, BACE1 permet la biosynthèse de multiples catabolites de manière directe et indirecte (Maia et Sousa 2019). Cette enzyme agit sur deux sites (β et β') de la protéine β APP : l'acide aspartique en position 1 (Asp1) et l'acide glutamique en position 11 (Glu11) de la séquence de l' $A\beta$ (Y. Deng et al. 2013). Les mutations familiales situées à proximité de la séquence d' $A\beta$ telle que la mutation suédoise (K595M596, KM670/671NL), favorise le clivage sur le site β au dépend du site β' . Cela engendre donc une augmentation des fragments C99 et $A\beta$ (Citron et al. 1992). A l'inverse la mutation islandaise protectrice, diminue la liaison de BACE1 sur le site β et réduit donc la production de ces deux fragments impliqués dans la MA (Jonsson et al. 2012). En effet, BACE1 forme les fragments APP β/β' solubles, le fragment C89 ou le fragment C99. Le CTF, C99, contribue aux dysfonctions endosomiales, autophagiques et lysosomiales. Ce fragment C-terminal entraîne une neuro-toxicité de manière précoce (Lauritzen et al. 2019, développé ultérieurement). Par la suite, le C99 ou le C89 est clivé par une deuxième enzyme, la γ -sécrétase (décrite ultérieurement) menant à la production du peptide amyloïde $A\beta_{x-40/42}$ et du fragment AICD.

Le rôle de BACE 2 dans la MA n'est pas encore très clair. L'expression de BACE 2 est à la hausse dans les maladies neurodégénératives, cependant plusieurs équipes catégorisent cette enzyme comme non amyloïdogène (Fluhrer et al. 2002; X. Sun, He, et Song 2006). Contrairement à BACE1, BACE 2 couperait la séquence $A\beta$ sur la Phe20, produisant le fragment C80. Par ailleurs, la surexpression de BACE2 dans des modèles murins permettrait une baisse de la production d' $A\beta$ (Azkona et al. 2010). Mais très récemment, un article (Z. Wang et al. 2019) montre que BACE 2 semble également jouer un rôle dans la pathologie. Une modification de l'hélice juxta-membranaire de la β APP (a.a 613 à 620), de manière artificielle ou par des mutants touchant cette zone (Flammande et Artique), dirigerait BACE 2 vers un clivage β -sécrétase. Il conclut que BACE 2 devient une β -sécrétase conditionnellement émergente au cours du vieillissement ou dans la MA (Holler et al. 2012).

iv. Les inhibiteurs associés

L'ensemble de ces catabolites produit par la cascade amyloïdogène, conduit au développement de la pathologie via leurs actions en tant que facteurs de transcriptions ou molécules neurotoxiques après une forte accumulation. Vu que l'enzyme est un facteur induisant ces catabolites toxiques, plusieurs études ont investigué les conséquences physiopathologiques de traitements pharmacologiques sur des modèles murins puis sur des patients. L'inhibition de BACE1 favorise la voie non-amyloïdogénique permettant la diminution des oligomères d'A β s et l'augmentation du peptide P3. De plus, les inhibiteurs de BACE1 diminueraient aussi le clivage de SEZ6 et agiraient sur les enzymes BACE2 et Cat D, vu la forte homologie structurelle avec BACE1 (Moussa-Pacha et al. 2020). Cependant, la plupart des inhibiteurs de BACE1 ont échoué. En effet, comme vous avez pu le constater dans la **section « Traitements thérapeutiques »** (Maia et Sousa 2019), les traitements ont peu d'effet à cause de la biodisponibilité.

(b) γ -Sécrétases

La γ -sécrétase est un complexe protéique désigné comme étant le protéasome de la membrane (Kopan et Ilagan 2004). De nombreuses questions restent encore en suspens du fait de sa complexité. Comment cette enzyme effectue l'hydrolyse de ses substrats dans un environnement hydrophobe, comment le substrat accède à la préséniline et comment chaque substrat est-il reconnu ? Ces zones d'ombre permettraient de mieux comprendre les effets néfastes des mutations sur *PSEN* et de créer une thérapie plus spécifique pour la liaison avec les CTFs, fragments de la β APP (M. S. Wolfe 2019b).

i. Structure et trafic cellulaire

Grâce à la cryo-EM et au criblage sur le nématode, *caenorhabditis elegans*, les équipes ont pu identifier les composants du complexe actif et son organisation. La γ -sécrétase est un regroupement de 4 protéines : la nicastrine (APH-2, NCT), Pen-2, APH-1 et PS1 ou PS2. La préséniline (PS) contient le site catalytique du complexe γ -sécrétase sur les résidus aspartiques 257 et 385 dans les domaines transmembranaires 6 et 7 (B. De Strooper, Iwatsubo, et Wolfe 2012; Bart De Strooper 2003, 1). Cette protéine est composée de 9 domaines transmembranaires (TM) avec deux fragments nommés : NTF et CTF. La partie CTF de la PS s'associe avec la protéine APH-1, elle-même attachée préalablement avec la nicastrine. L'association de la

nicastrine et de APH-1 permet la stabilisation de la préséniline (Yun-wu Zhang et al. 2005) par l'insertion des résidus FYI, dans la partie hydrophobe d'APH-1. Par ailleurs, le motif YN de la sous-unité NTF PS se lie avec le domaine TM 4 de Pen-2. L'ensemble de ces interactions permet l'endoprotéolyse de la préséniline entière et promeut son pouvoir catalytique. La nicastrine contrôle l'assemblage du complexe en stabilisant les protéines et contient un motif DYIGS impliqué dans la liaison avec le substrat (Figure 14). Pen-2 quant à elle, joue un rôle dans l'assemblage final du complexe et l'activation fonctionnelle de la γ -sécrétase. Les 4 composés s'assemblent dans le RE puis le complexe est transporté via la voie sécrétoire aux réseaux Golgiens pour subir des modifications post-traductionnelles. Cependant une absence de la PS perturbe la maturation de la nicastrine et cette sous-unité ainsi que Pen-2 sont séquestrées dans le RE (De Strooper et Annaert 2010; Meckler et Checler 2016; Yu et al. 2000 ; Zhang et al. 2005).

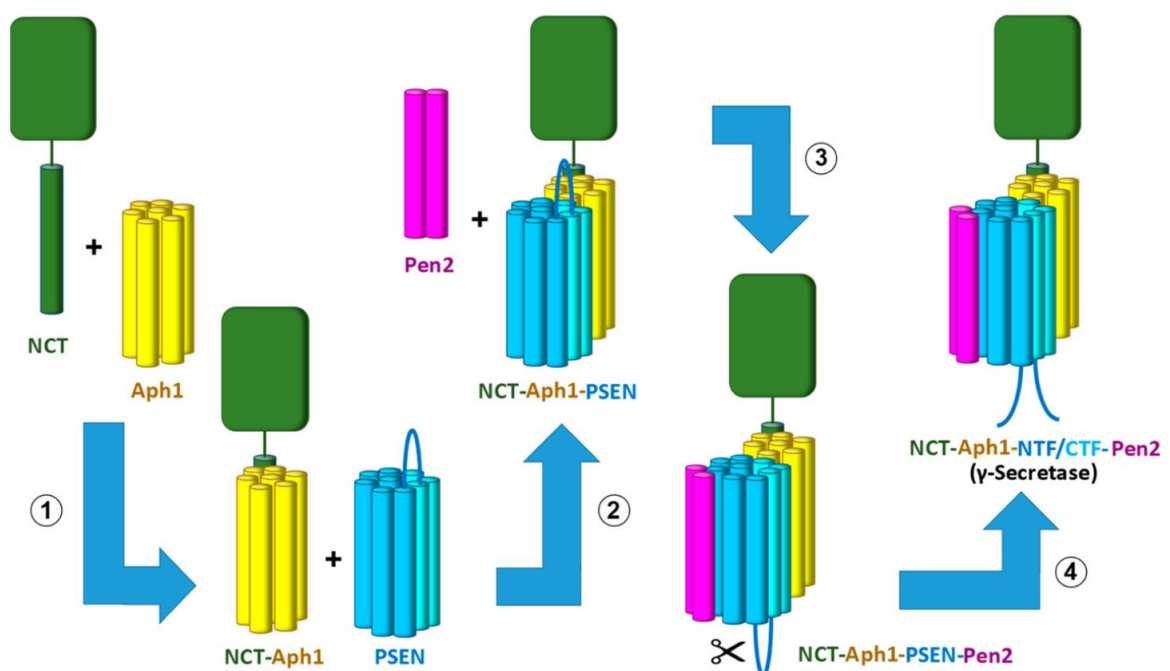


Figure 14: Assemblage du complexe γ -sécrétase (M. S. Wolfe 2019b). (1) Formation du sous-complexe APH-1 et nicastrine (NCT), suivi de l'association de la préséniline (2) ainsi que de Pen-2 (3). L'association avec Pen-2 déclenche l'autoprotéolyse pour former la γ -sécrétase active (4).

ii. Fonctions physiologiques et substrats

La γ -sécrétase est un complexe appartenant aux protéases I-CLiPs (intramembrane-cleaving proteases) et coupe des protéines transmembranaires à hélice de type 1. Physiologiquement, on recense plus de 90 protéines comme étant des substrats de la γ -sécrétase (Kopan et Ilagan 2004). Généralement la coupure de cette enzyme libère deux produits : un fragment extracellulaire pouvant être sécrété par la cellule et un domaine intracellulaire, souvent nommé ICD, régulant la transcription des gènes. De nombreux substrats tels que Notch, la N-cadhérine, CD44 ou Erb-B4 régulent l'adhésion, l'apoptose et les excroissances cellulaires (M. S. Wolfe 2010). En effet, un knock-in de Notch avec une mutation sur la zone de fixation avec la γ -sécrétase, mène à la létalité *in vivo*. La N-cadhérine intracellulaire après clivage, se lie avec CBP pour promouvoir la migration et la dégradation par le protéasome. Cependant, les rôles exacts des fragments produits par le complexe ne sont pas encore tous connus (Haapasalo et Kovacs 2011).

En dehors de l'activité γ -sécrétase, la préséniline joue un rôle dans le trafic, la protéolyse et la dégradation protéique (Duggan et McCarthy 2016). La PS1 interagit avec Rab11, régulant le transport vésiculaire. D'autre part, des neurones dépourvus de PS1 montrent une baisse du trafic des récepteurs EphB ou TrkB à la membrane plasmique ce qui diminue donc l'effet neuroprotecteur de ces récepteurs. Ces résultats montrent que la préséniline a aussi un rôle de protéine chaperonne dans le RE et le Golgi. Les mutations de la préséniline révèlent également un rôle dans la dégradation via un défaut d'acidification des lysosomes. Ne se liant plus avec la sous-unité V0a1 de la pompe vATPase, la préséniline réduit l'acidification des lysosomes et provoque une dysfonction de la voie autophagique.

iii. Fonctions dans la formation des catabolites de la β APP : coupure γ

La γ -sécrétase clive la protéine β APP dans les deux voies canoniques mais aurait une préférence pour la voie non amyloïdogénique (Funamoto et al. 2013). Dans le contexte physiologique et de la MA, cette enzyme engendre la libération des molécules $A\beta_{40}/AICD_{50-99}$ et $A\beta_{42}/AICD_{49-99}$ (Zhou et al. 2019). En se focalisant sur la coupure de C99, des équipes ont pu montrer que la γ -sécrétase effectue une succession de clivages pour générer l' $A\beta_{40}$ et l' $A\beta_{42}$ (Figure 15). En effet, le substrat subit une endoprotéolyse générant l' $A\beta_{48}$ ou $A\beta_{49}$ puis une activité carboxypeptidase, éliminant des tripeptides dans la région C-terminale du peptide amyloïde (Y. Li et al. 2014 ; Takami et al. 2009). Des individus portants des mutations

héréditaires sur la *PSEN1* ou la *PSEN2* sont sujets à développer la pathologie et montrent également l'importance de la γ -sécrétase dans le développement des formes familiales de la MA. Les altérations de conformation de la préséniline sur le site de liaison avec le substrat CTF interfèrent lourdement sur son site de clivage en favorisant l'endoprotéolyse ϵ ($A\beta_{48}/AICD$ 50-99) et provoque l'augmentation du ratio $A\beta_{42}/A\beta_{40}$ (Bart De Strooper et al. 1998; Fukumori, Feilen, et Steiner 2020; M. S. Wolfe 2019a). Par ailleurs, les défauts de l'activité carboxypeptidase et le changement de localisation de la PS1 contribuent aussi à la production d' $A\beta$. En effet, la préséniline 1 est habituellement répartie dans l'ensemble de la cellule de manière hétérogène. Cependant lors de certaines mutations, la PS1 se comporte comme la PS2 avec une localisation dans les endosomes tardifs et les lysosomes (Meckler et Checler 2016; Sannerud et al. 2016 ; Steiner et al. 2018).

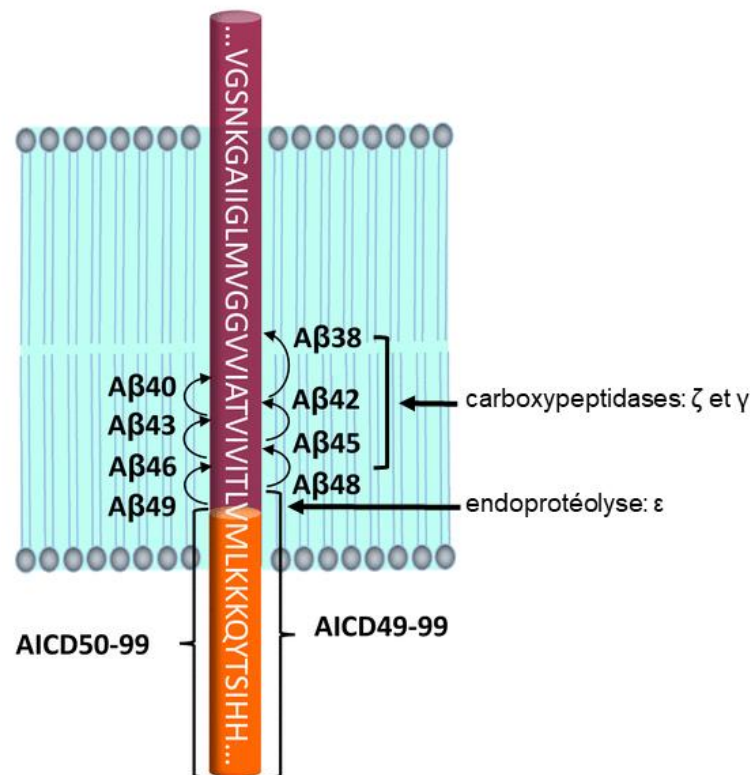


Figure 15 : Voie de clivage des CTFs par la γ -sécrétase. (d'après M. S. Wolfe 2019)
 La protéolyse initiale se produit près de l'extrémité C-terminale du domaine transmembranaire, produisant de l'AICD et soit de l' $A\beta_{48}$ ou de l' $A\beta_{49}$. Ces longs peptides $A\beta$ sont ensuite coupés par une fonction carboxypeptidase de la γ -sécrétase pour produire les formes sécrétées d' $A\beta$. L'idée suggère deux voies de production d' $A\beta$ s : $A\beta_{49} \rightarrow A\beta_{46} \rightarrow A\beta_{43} \rightarrow A\beta_{40}$ et $A\beta_{48} \rightarrow A\beta_{45} \rightarrow A\beta_{42} \rightarrow A\beta_{38}$

iv. Les inhibiteurs associés à la γ -sécrétase

Le composé DAPT est le premier inhibiteur de la γ -sécrétase développé et testé *in vivo* par les compagnies Elan et Eli Lilly (Dovey et al. 2009). Cet agent a montré pour la première fois, une réduction du niveau d'A β dans un modèle murin après administration par voie orale. Cependant, une certaine toxicité était à déplorer. Une conversion du DAPT, le LY411-575 se lie avec la PS-NTF et le composé est à l'interface des hétérodimères. Après administration, on peut mettre en évidence une réduction du niveau d'A β dans le LCR, le plasma et le cerveau. Après les premiers essais cliniques chez l'homme, les résultats ne sont pas positifs sur le niveau d'A β et une augmentation de la dose aurait sans doute des effets secondaires sur Notch (M. S. Wolfe 2009). Pour éviter ces effets secondaires, les compagnies ont testé des modulateurs de la γ -sécrétase et non des inhibiteurs. Les anti-inflammatoires non stéroïdiens (ibuprofen) peuvent réduire l'agrégation d'A β_{42} en augmentant les formes A β_{38} et n'impactent pas le métabolisme et les fonctions de Notch dépendants de la γ -sécrétase. Les derniers composés montrant ces effets sont le BPN-15606 et le PF-06648671 (Ahn et al. 2020; Nie, Vartak, et Li 2020; S. L. Wagner et al. 2017)

(c) Une nouvelle sécrétase : l'Eta-sécrétase

i. Structure et fonction des MMPs

Depuis quelques années, des équipes de recherche ont étudié les MMPs comme biofacteurs jouant sur les processus neurodégénératifs (Santiago Rivera et al. 2019). Les études portant sur les métalloprotéinases dénotent l'intérêt à mieux connaître ces enzymes puisqu'elles sont impliquées dans le clivage de la protéine β APP (Figure 12). La famille MMPs se compose de 24 protéinases, réparties en 5 catégories : les gélatinases, les stromelysines, les collagénases, les MMPs type membrane (MT-MMPs) et les non classées. L'ensemble des MMPs présente un peptide signal hydrophobe, un pro-domaine se liant aux résidus cystéine et Zn^{2+} du site catalytique et le domaine catalytique. La rupture entre les résidus cystéine et le Zn^{2+} via une autocatalyse ou via la furine protéinase entraîne son activation dans le réseau trans-golgien (Okada 2017; S. Rivera et al. 2010). Généralement considérés comme enzyme de dégradation de la MEC (Rosenberg 2017), plusieurs substrats révèlent une diversité fonctionnelle. Les MMPs, exprimées dans l'ensemble des cellules du SNC, jouent un rôle (1) dans la protéolyse de la MEC, (2) dans la prolifération, la migration et la différenciation cellulaire, (3) dans la

modulation des médiateurs inflammatoires et (4) dans la perméabilité de la BHE (Rosenberg 2002). L'activité de cette enzyme peut être modulée par la protéine TIMP (Ould-yahoui et al. 2009). Les 4 isoformes de TIMP se lient sur la région N ou C-terminale des MMPs pour inhiber leur activité. Dans la maladie d'Alzheimer, les neurones hippocampiques des patients révèlent une augmentation du niveau de MMP9 immatures (Backstrom et al. 1996). Principalement, les MMPs sont considérées comme bénéfiques via le clivage de l'A β mais des études montrent une implication délétère par le défaut de perméabilisation de la BHE, de la formation de catabolites de la β APP et via la protéine TIMP (Santiago Rivera et al. 2019). En effet, une surexpression de MMP9 dans des souris WT (sauvage) augmente le niveau d'APP α s et améliore donc les capacités d'apprentissage et de mémorisation. Par spectrométrie de masse, MMP9 et MMP2 semblent cliver l'A $\beta_{40/42}$ sur 3 sites: le site de clivage de l' α -sécrétase en position Lys¹⁶-Leu¹⁷ et les sites du domaine membranaire en position Leu³⁴-Met³⁵ et Ala³⁰-Ile³¹ (Backstrom et al. 1996). MMP2, pour sa part, paraît plus efficace au clivage du peptide A β_{42} que MMP9 (Hernandez-Guillamon et al. 2015 ; Rivera et al. 2019). La perméabilisation de la BHE et indirectement le processus inflammatoire sont aussi compromis chez les patients MA. Les MMPs jouent un rôle dans le maintien des jonctions serrées entre les cellules astrocytaires et les cellules endothéliales et évitent l'infiltration des neutrophiles (Prinz et Priller 2017). Des travaux exposant l'A β_{42} sur les cellules astrocytaires, microgliales ou monocytaires dévoilent une activation des MMP-9, une réduction de claudine-5, une réactivité microgliale interférant avec la clairance d'A β à travers la BHE et une hausse des molécules TNF- α et Il-1 β (Achilli, Ciana, et Minetti 2014 ; Mazzitelli et al. 2016 ; Spampinato et al. 2017).

A partir de 2003 (Higashi et Miyazaki 2003), des chercheurs ont découvert un processus alternatif coupant la protéine β APP. Dans cette première étude, on observe que MT1-MMP est responsable de la formation d'un fragment d'APP soluble conduisant à une réduction de l'inhibition de la gélatinase A. Dans des travaux additionnels (Figure 16), les MT1/3/5-MMP exercent une coupure sur la β APP en libérant 5 fragments. MT3-MMP ne semble pas modifier le niveau d'A β dans les cellules car la zone de clivage correspond au site α -sécrétase dans la séquence A β . Par contre, MT1/5-MMP participeraient à la pathogénèse de la MA. MT5-MMP présente une activité η -sécrétase, produisant les fragments η -CTF (ou CTF-30) de 30 kDa, A η - α et A η - β de 12 kDa à partir de la β APP (Ahmad et al. 2006; Baranger, Marchalant, et al. 2016; Goiran et al. 2018; Willem et al. 2015). Dans des croisements entre des souris 5xFAD et des souris invalidées pour la MT5-MMP (MT5-MMP^{-/-}), on observe une réduction drastique des plaques amyloïdes ainsi que du niveau de C99 et η -CTF. La baisse du C99 et d'A β permet une

baisse de la réactivité gliale dans différentes aires cérébrales (Baranger et al. 2016 ; Baranger, Marchalant, et al. 2016). Par ailleurs même si le mécanisme exact n'est pas encore élucidé, on peut remarquer que la MT5-MMP est présente, comme la protéine β APP dans le système endosomal, lieu majeur de la production du peptide amyloïde. De plus les fragments η -CTF_s semblent contribuer à la propagation de la MA via leur présence dans les exosomes (Laulagnier et al. 2018). Même si des études témoignent que l'activité η -sécrétase n'est médiée que par la MT5-MMP, une équipe révèle une surexpression de MT1-MMP dans les souris 5xFAD et la surexpression de cette enzyme dans des cellules HEKswe stimule la production d'A β et de C99 (Py et al. 2014). De manière intéressante, il a été noté que MT1/5-MMP auraient un rôle de substitut en potentialisant leur clivage sur β APP lors d'une inhibition de BACE1 (Paumier et al. 2019).

En ce qui concerne l'inhibiteur endogène des MMPs, les résultats sur son implication dans la pathologie sont confus. Les premiers travaux montrent la présence de TIMP-1, associée aux plaques neuritiques et Tau anormalement phosphorylée (Peress, Perillo, et Zucker 1995). Cependant selon les cohortes, les résultats n'indiquent pas les mêmes conclusions sur TIMP1 et TIMP2. Il semblerait que TIMP-1 et TIMP-2 pourraient être des biomarqueurs plasmatiques et LCR intéressants pour distinguer les patients atteints de démences vasculaires de ceux atteints de la MA (Bjerke et al. 2011 ; Lorenzl et al. 2008). Dans la démence vasculaire, on peut souligner une baisse du niveau plasmatique de TIMP-1/2 et une hausse de TIMP-1 dans le LCR. Même si le niveau d'ARNm de TIMP-2 ne semble pas être modifié dans les souris 5xFAD, des récentes découvertes du groupe du Dr Wyss-Coray suggèrent que TIMP-2 comme facteur anti-âge (Castellano et al. 2017 ; S. K. Park et al. 2009). Il favoriserait la neuroplasticité, y compris la LTP et la cognition dépendante de l'hippocampe. TIMP-2 pourrait donc participer dans la prévention de la MA. Pour TIMP-3 et TIMP-4, ces inhibiteurs semblent être à la hausse dans le cerveau et dans le plasma. TIMP-3 inhibe le clivage de la β APP par les α -sécrétases ADAM10 et ADAM17, entraînant une augmentation des niveaux de C99 et d'A β (Hoe et al. 2007). TIMP-4, beaucoup moins étudié, montre des niveaux positivement corrélés avec la gravité de la pathologie (Qin et al. 2015).

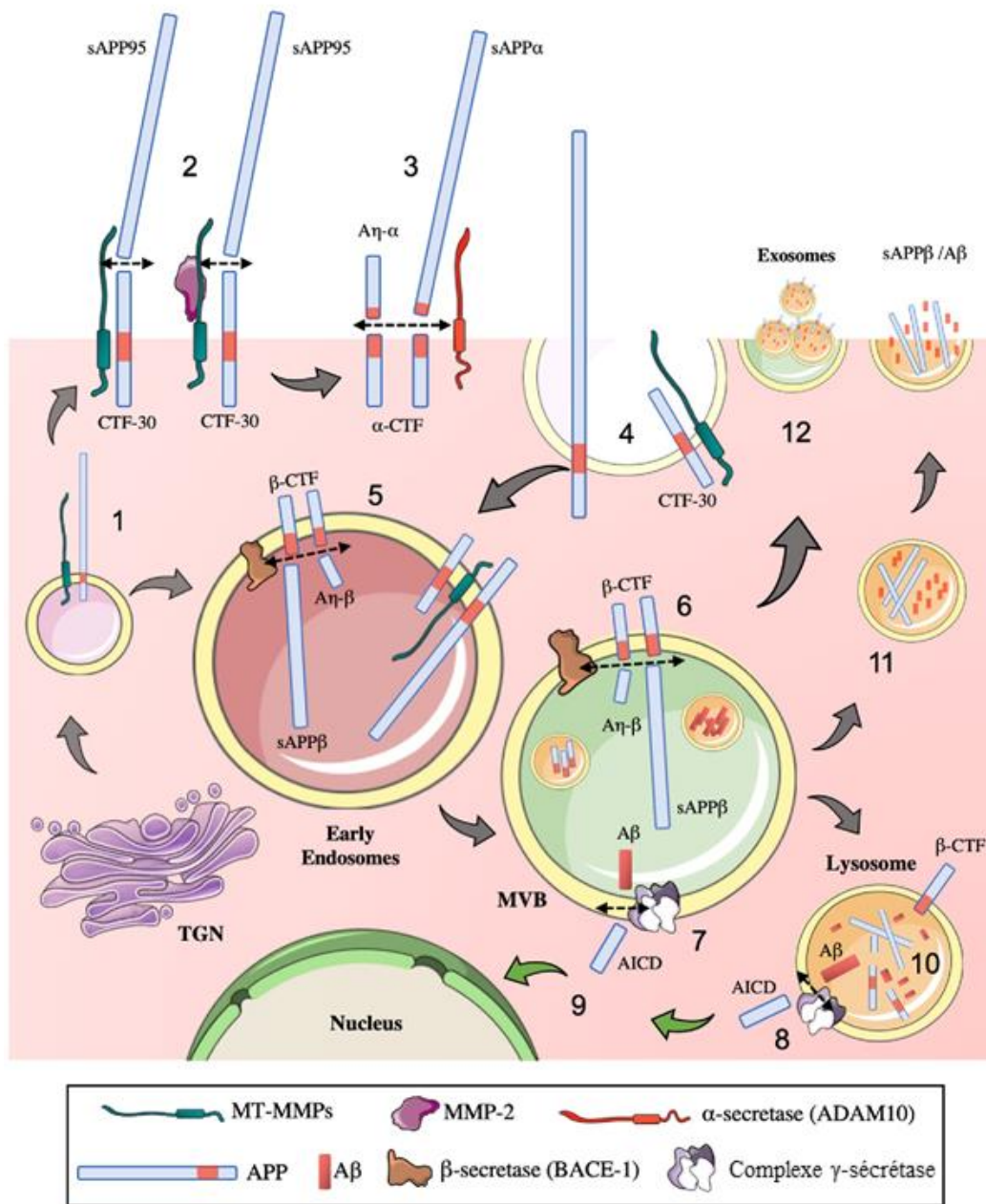


Figure 16 : Récapitulatif de la localisation et des rôles des MMPs dans la voie amyloïdogénique (d'après Rivera et al. 2019). Les MMPS et la β APP sont transportées à la membrane plasmique ou dirigées dans la voie endocytaire (1/4). Ces deux compartiments permettent aux MMPs de cliver la β APP produisant l' η -CTF mais aussi l' $A\eta-\alpha$ et l' $A\eta-\beta$ grâce à la présence de l' α ou β -sécrétase (2/3/5). Ces différents fragments sont retrouvés dans les endosomes, dans les corps multi-vésiculaires, dans les exosomes et dans le milieu extracellulaire (6/11/12). Les autres catabolites de la β APP tels qu' $A\beta$, AICD ou β -CTFs sont retrouvées également ainsi que dans autres compartiments cellulaires : noyau et lysosomes (7/8/9/10).

4. Les fragments protéolytiques issus du clivage primaire de la β APP et leur implication dans la pathologie

(a) Les fragments sAPP α et sAPP β

i. Fonctions physiologiques

Ces deux fragments ont pour similarité la séquence N-terminale de la protéine β APP, à l'exception de 16 acides aminés (Figure 17). Cette différence pouvant paraître infime, donne des rôles très divers en condition physiologique et pathologique (Chasseigneaux et Allinquant 2012). sAPP α est produit tout au long de la vie et entre autre, pendant le développement du cerveau (Corbett et Hooper 2018). Durant la période critique de la synaptogénèse, sAPP α est surproduit permettant l'augmentation de la densité synaptique et la stabilisation du réseau (Dar et Glazner 2020). Ces caractéristiques lui confèrent son rôle dans la croissance et l'élimination synaptique. En effet (Ring et al. 2007), des souris KO APP présentent une diminution de la taille du cerveau, une baisse de l'activité locomotrice et des défauts dans l'apprentissage et la préhension. Ces souris croisées avec des souris knock-in pour sAPP α ne présentent plus aucun de ces symptômes, ce qui souligne son rôle important durant la synaptogénèse. Une autre étude montre même, que des rongeurs sains supplémentés en sAPP α améliorent leur mémoire et la consolide (Fol et al. 2016; Taylor et al. 2008). sAPP α assure d'autres fonctions, telles que les excroissances neuritiques ou la prolifération cellulaire mais les mécanismes ne sont pas encore élucidés. L'équipe d'Hasebe suggère que sAPP α joue sur les excroissances en se liant à des protéines de surface telles que p75^{NTR} (Hasebe et al. 2013). Par ailleurs, d'autres équipes évoquent un lien entre le récepteur NMDA et sAPP α via la voie ERK/MAPK. Cette interaction faciliterait la potentialisation à long terme (LTP) par une régulation de la formation et de la transmission de récepteurs NMDA (Klatt et al. 2013).

sAPP β est, quant à elle (Chasseigneaux et Allinquant 2012), une protéine n'ayant pas d'effet neuro-protecteur contrairement à sAPP α . sAPP β n'est pas impliquée dans la réduction de la mort cellulaire, la LTP et un knock-in de sAPP β ne permettent pas de récupérer la létalité du KO APP (Weyer et al. 2011). Des études expliquent cependant que l'APP β induirait la différenciation neuronale dans des cellules souches embryonnaires humaines (Barger et al. 1995 ; Chasseigneaux et al. 2011) et stimulerait les cellules microgliales, autant que le sAPP α . Pour plus de clarté sur le rôle physiologique de la protéine sAPP β , une équipe germanique a

dévoilé que le sAPP β exerçait un effet neurotrophique sur le système glutamatergique, même si son implication paraît tout de même moins importante que celle du sAPP α .

ii. Toxicité des fragments sAPP α et sAPP β

Bien que les fragments sAPP α et sAPP β présentent des fonctions neurotrophiques, un défaut dans leur production entraîne des fonctions délétères pour l'organisme amenant à diverses pathologies. Une dérégulation de l'expression du sAPP α est présente dans les souris KO FMR1, modèle du syndrome X fragile (Pasciuto et al. 2015). L'équipe du Dr Pasciuto observe une augmentation de la présence de sAPP α . Cela est associé avec une augmentation de la synthèse et des formes immatures des épines dendritiques et des défauts de plasticité synaptique. Plus précisément, ils observent une dérégulation de l'APP et d'ADAM10 menant à un excès du fragment sAPP α et conduisant à une activation de la voie MAPK. L'ensemble de ces observations aboutit à un déficit synaptique et comportemental. En condition ex vivo, une autre étude démontre qu'un excès d'APP α sur des coupes d'hippocampes altère la LTP (Taylor et al. 2008), preuve supplémentaire qui appuie l'hypothèse qu'un excès d'APP α peut affecter le bon fonctionnement du cerveau. En parallèle, il a été aussi mis en évidence que le sAPP α est impliqué dans l'autisme et dans les cancers. En effet, un niveau élevé du sAPP α a été décelé dans le plasma et le cortex insulaire chez des patients atteints d'autisme, induisant un déséquilibre entre les synapses excitatrices et inhibitrices et une myélinisation excessive (Bailey et al. 2012; Carter 2019). On peut aussi retrouver une altération du comportement social, caractéristique des personnes autistes, dans des souris surexprimant le sAPP α . Dans le cas des cancers pancréatiques, thyroïdiens ou du côlon, la sécrétion de sAPP α est amplifiée par le facteur de croissance EGF (médié par la cascade Erk), par la PKC α et par la voie Akt/PI3K. La hausse de ce fragment est corrélée avec la prolifération et la motilité cellulaire, paramètres importants pour le développement de cancer (Galvão et al. 2019 ; Pandey et al. 2016).

Dans le cas de la maladie d'Alzheimer ou de cerveaux âgés, plusieurs articles démontrent l'implication de la voie amyloïdogène dans la neurodégénération. Cependant, il a été démontré que le sAPP α est diminué chez les patients MCI et MA et que cela est corrélé avec les défauts de mémoire. Chez des rats âgés, une publication trouve une baisse de 50% d'APP α dans le liquide céphalo-rachidien (Anderson et al. 1999). APP α aurait aussi le récepteur endocytaire SorLA (Rohe et al. 2008) comme régulateur de son expression et modulerait son activité neurotrophique. L'ensemble de la communauté scientifique confirme l'effet bénéfique

du sAPP α (Hesse et al. 2018 ; Tan et al. 2018) sur l'atténuation des symptômes caractéristiques de la MA. Plusieurs laboratoires observent des effets du sAPP α sur l'état de phosphorylation de la protéine Tau (J. Deng et al. 2015) et sur le peptide amyloïde (Fol et al. 2016). Dans des modèles *in cellulo* ou *in vivo*, sAPP α diminue A β via BACE1 (Obregon et al. 2012) et la phosphorylation de Tau via GSK3- β (Milosch et al. 2014). En approfondissant le mécanisme, plusieurs équipes suggèrent que sAPP α agit indirectement sur la phosphorylation de Tau via la voie CDK5. D'autre part, APP α agirait sur la clairance d'A β et sur la LTP. En effet, la surexpression d'APP α dans des souris Alzheimer montre une meilleure induction de la LTP, active les cellules microgliales autour des plaques et augmente l'expression de TREM2 et des IDEs (Habib, Sawmiller, et Tan 2017).

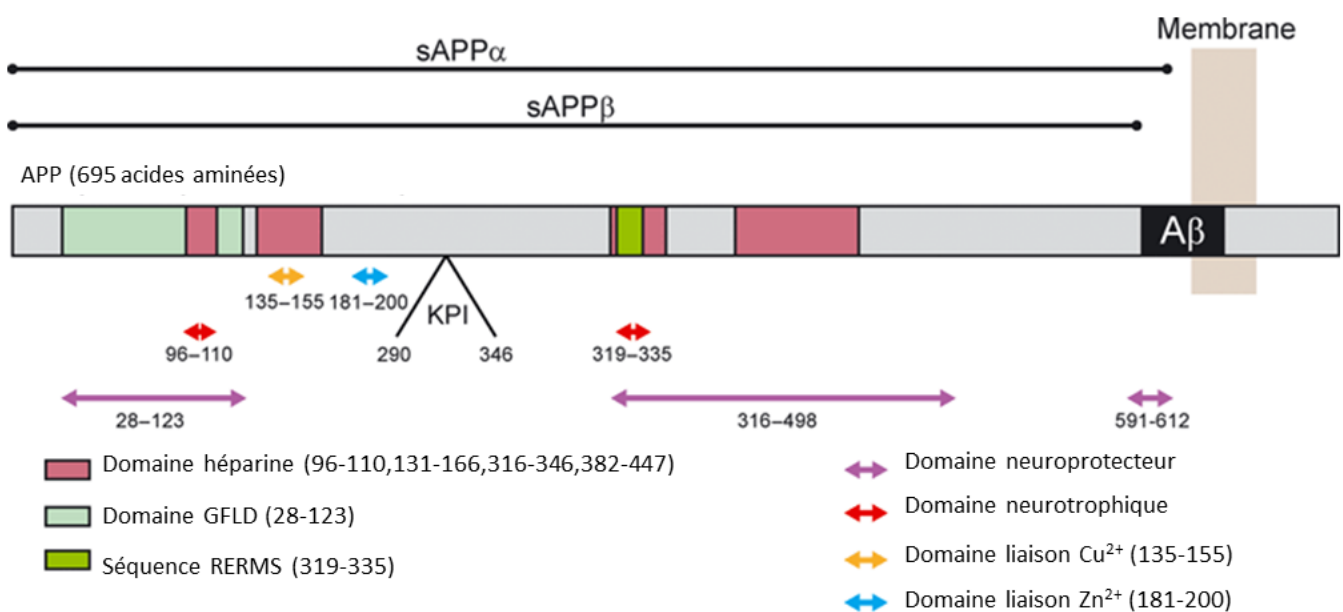


Figure 17 : Schéma de la structure de sAPP α et de sAPP β (d'après Chasseigneaux et Allinquant 2012). Les différents domaines présentés dans la figure ci-dessus confèrent aux fragments APP α et APP β , la fonction de croissance neuritique. Une mutation altère automatiquement leur structure secondaire et donc leur fonction (T. L. Young-Pearse et al. 2007). Les nombres des acides aminés correspondent à l'APP695.

En ce qui concerne sAPP β , plusieurs mécanismes sont investigués et ce fragment représente un biomarqueur potentiel pour la MA (Alexopoulos et al. 2018). Dans les souris transgéniques APP23, un effet protecteur de la transthyréine contre la toxicité d'A β a été mis

en évidence (Buxbaum et al. 1998). Cette protéine est connue pour être libérée par l'APP β , ce qui lui confère un effet protecteur contre la toxicité d'A β . Une autre étude plus fondamentale énonce l'effet délétère d'APP β et sa toxicité. Cet article (Botteri et al. 2018) stipule que l'augmentation de BACE1 causée par le palmitate contribue au stress du RE, à l'inflammation et à la résistance à l'insuline dans les cellules du muscle squelettique. sAPP β semble avoir les mêmes effets que le palmitate sur BACE ainsi que sur les protéines cibles. sAPP β est impliqué dans la régulation des gènes FAO (oxydation des acides gras) et OXPHOS (chaîne respiratoire mitochondriale). Une administration aiguë de sAPP β conduit donc à une augmentation des marqueurs inflammatoires tels qu'IL-6 et réduit la sensibilité à l'insuline en affectant la gluconéogenèse du foie (Botteri et al. 2018).

(b) Les fragments CTFs : C99/C83

Conjointement avec la formation des fragments solubles sAPP α/β , le clivage canonique de la protéine β APP conduit à la production de deux fragments C-terminaux nommés C99 et C83 (β -CTF). Plus récemment, des travaux de recherche ont démontré que le peptide A β était loin d'être le seul fragment toxique déclenchant la MA. Au contraire, mon équipe (I. Lauritzen et al. 2012) ainsi que celle du Dr Nixon (Nixon 2017) ont prouvé que le C99 agirait de manière précoce dans la pathologie en déséquilibrant la voie lysosomiale-autophagique et mitochondriale (Vaillant-Beuchot et al. 2020).

i. Toxicité de ces fragments

Malgré une meilleure compréhension de la structure, de la localisation et de l'effet de C99, de nombreuses questions restent toujours en suspens. En effet la formation du C99 par la β -sécrétase lui confère une structure de type hélice α qui lui procure des propriétés de liaison avec des protéines membranaires ou des lipides (Figure 18). Une équipe aux USA (Pantelopulos et al. 2018) révèle que la structure de C99 et l'interaction avec ses partenaires sont dépendantes de la finesse, de la courbure et de la composition lipidique de la membrane plasmique. Ces modifications structurelles lui permettent de modifier la production du peptide A β , d'interagir avec lui et de s'auto-oligomériser. Dans le cas de la MA, C99 est présent en intra-neuronal dans différents modèles murins et cellules iPSCs de patients et s'accumule en fonction de l'âge (Kwart et al. 2019). Le Dr Inger Lauritzen (I. Lauritzen et al. 2012, 2019; Inger Lauritzen et al. 2016) a révélé par immunohistochimie via de multiples anticorps, la présence de cette protéine

dans des structures positives pour les cathepsines et LAMP2 chez les souris 3xTg-AD. Dès l'âge de 3 mois, le C99 semble s'accumuler dans ces structures et interférer donc avec la voie lysosomiale-autophagique (Kaur et al. 2017). Pour approfondir les connaissances sur l'action de C99 dans le développement de la pathologie, mon laboratoire d'accueil a utilisé divers modèles murins: les 2xTg, les 3xTg-AD et les souris WT injectées avec un AAV-C99 (Bourgeois et al. 2018). Les différents modèles murins (en présence ou absence d'inhibiteur de la γ -sécrétase) révèlent que l'accumulation de C99 entraîne un défaut de la voie lysosomiale-autophagique ainsi que des troubles comportementaux. Il a été mis en évidence que les cathepsines et le C99 participaient aux dysfonctionnements lysosomiaux-autophagiques (Colacurcio et al. 2018). Cela démontre une boucle sans fin qui aboutit à augmenter un déséquilibre cellulaire entraînant le développement de la pathologie. D'autres études confirment ces faits en démontrant que les défauts lysosomiale-autophagiques contribuent à la dégénération cholinergique, aux défauts neuritiques et à l'acidification des lysosomes. Dans les conditions *in vivo*, les souris 2xTg et AAV-C99 montrent aussi un défaut d'apprentissage (piscine de Morris) ajoutant un argument sur l'effet toxique de ce fragment de façon indépendante d'A β . De manière indirecte, une autre étude observe que le C99 interagit avec le TMEM30 (Takasugi et al. 2018), une protéine membranaire connue pour le recyclage endocytaire et candidate comme récepteur du peptide A β . Cet article rapporte que l'interaction entre le β -CTF et TMEM30 cause un défaut de trafic vésiculaire et forme des endosomes larges anormaux, représentant donc un mécanisme inconnu et pathogénique.

Le fragment C99 a cependant été découvert dans d'autres structures : les exosomes, les mitochondries et les MAMs (Figure 18). En effet, notre équipe ainsi que celles des Drs Levy (Perez-Gonzalez et al. 2012 ; Pérez-González et al. 2019) et Area-Gomez (Pera et al. 2017) révèlent la présence des β -CTFs dans ces compartiments cellulaires. Grâce à des fractionnements enrichis en MAMs, mitochondries ou en exosomes, ces études montrent la présence de C99 et C83. Cette observation est associée avec une augmentation de contact entre le RE et la mitochondrie jouant sur l'homéostasie des sphingolipides et du cholestérol et sur le clivage de la protéine β APP. Une autre étude montre que l'altération du renouvellement des sphingolipides via C99 dans les MAMs aboutit à une augmentation des céramides altérant l'activité de la chaîne respiratoire ainsi que son assemblage (Pera et al. 2017). Mon équipe d'accueil démontre que le fragment C99 contribue aussi à une altération morphologique de la mitochondrie et à un défaut de mitophagie. En effet, l'accumulation des β -CTFs conduit à une hausse de protéines mitochondriales telles que Timm23 ou Tomm20 et de protéines de la voie

mitophagique telles que LC3I, LC3II, PINK, Parkin et p62. L'ensemble de ces dérégulations engendre la dysfonction mitochondriale et la pathogénicité (Del Prete et al. 2017 ; Vaillant-Beuchot et al. 2020). En ce qui concerne la présence des fragments β -CTFs dans les exosomes (Inger Lauritzen et al. 2019), notre équipe a effectivement observé que les fragments C99/C83 étaient présents dans ces structures mais qu'il existe aussi des formes agrégées de C99 ou C83 agissant hypothétiquement sur la propagation de la pathologie. On spéculé aussi que les β -CTFs seraient potentiellement un facteur de la neuro-inflammation étant donné que le traitement avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase chez les souris entraîne une activation microgliale et une augmentation des protéines pro-inflammatoires.

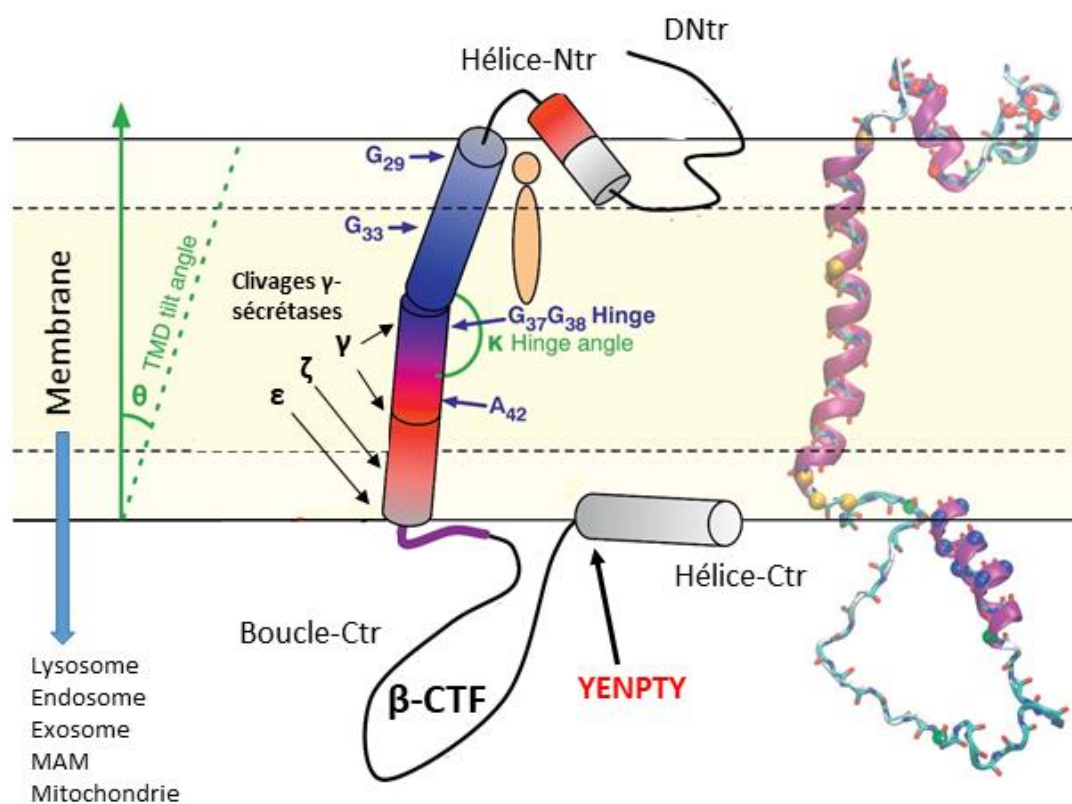


Figure 18 : Structure du C99 (Pantelopulos et al. 2018). Les dysfonctions produites par le C99 dépendent des mutations (en bleu), de sa localisation subcellulaire, de sa liaison avec le cholestérol (zone en orange) et de ses angles θ et κ (en vert). Ces paramètres influencent le clivage des différents sites de la γ -sécrétase.

ii. Agrégation des CTFs

Au vu de sa structure particulière, plusieurs équipes s'intéressent à la dimérisation du fragment C99. En effet, le motif répété GxxxG (Kienlen-Campard et al. 2008) favorise son homo-dimérisation ou sa liaison avec le cholestérol (Beel et al. 2010). Une compétition forte existe entre ces deux mécanismes (Figure 19) et biochimiquement, il a été constaté que la constante de dissociation favorisait la liaison avec le cholestérol en condition physiologique (Y. Song et al. 2013). Dans le cas de la MA, il est important de souligner la forte présence de cholestérol qui expliquerait en partie la production des peptides amyloïdes. En effet, la « monomérisation » du C99 est favorisée par son association avec le cholestérol au lieu de sa dimérisation, sa présence dans les rafts lipidiques et son clivage par la γ -sécrétase (Figure 19). Des études stipulent que des mutations transformant les glycines 29 ou 33 en leucine altéreraient dramatiquement la production des peptides $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$ (Figure 18). Cela pourrait s'expliquer par une diminution d'association du C99 avec le cholestérol en favorisant sa dimérisation. En effet, une publication de mon équipe montre la présence des hauts poids moléculaires dans les exosomes mais on peut aussi observer une augmentation de ces formes agrégées (C99, C83) dans des cellules HEK transfectées transitoirement avec la double mutation G29L/G33L (Inger Lauritzen et al. 2019) .

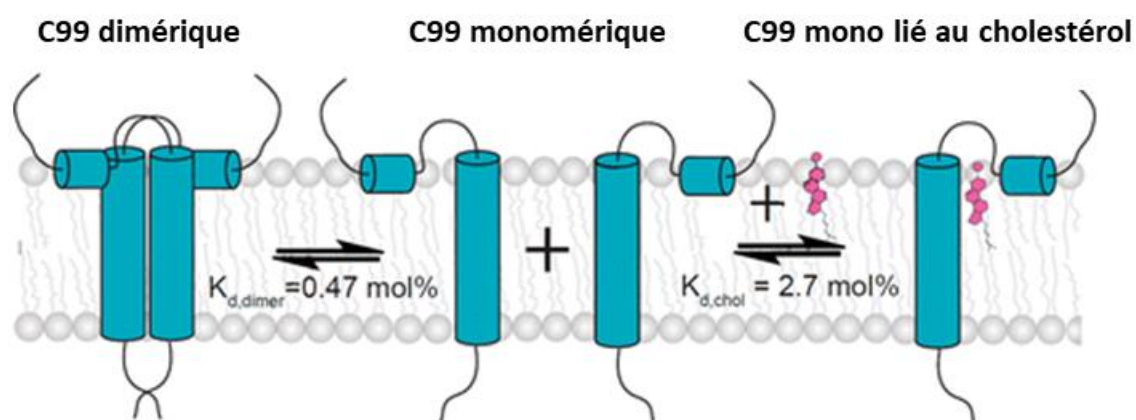


Figure 19: Compétition conformationnelle du C99 : homodimérisation ou liaison avec le cholestérol (d'après Y. Song et al. 2013). Par des techniques de FRET et d'EPR, cette équipe a déterminé les K_{ds} et suggère que la liaison avec le cholestérol est plus présente que l'homodimérisation en condition physiologique.

Par ailleurs, ces résultats dénotent que l'inhibition de la γ -sécrétase augmente la présence de formes agrégées de C99. Les formes agrégées des β -CTFs pourraient donc expliquer les résultats du Dr Kienlen-Campard avec la formation d'A β oligomère dans les cellules ayant les différentes mutations (Decock et al. 2016). Une meilleure compréhension de l'utilité de cette dimérisation aboutirait à des voies thérapeutiques potentielles. Cependant, l'hypothèse de mécanisme de dimérisation et de production des formes d'A β reste débattue. L'équipe du Dr Munter montre que le domaine transmembranaire de la β APP, correspondant à la partie β -CTFs, réduit le niveau d'A β_{42} en faveur de la forme A β_{38} . En 2017, une équipe indique que les 4 acides aminés (TVIV) suivant la séquence A β_{42} seraient aussi déterminants pour l'homo-dimérisation de C99 et que des mutations familiales altèreraient cette voie en favorisant le ratio A β_{42} /A β_{40} . Les multiples articles ne nous permettent pas de conclure si la dimérisation est bénéfique ou délétère sur la production des diverses formes d'A β mais son homodimérisation dépend cependant de la conformation du C99 avec les angles κ et θ , de l'environnement subcellulaire (pH, lipides...) et de la présence du complexe γ -sécrétase (Y. Jiang et al. 2019).

(c) AICD

La formation du domaine intracellulaire de la β APP (AICD) à la fois dans la voie non-amyloïdogène et amyloïdogène est un argument fort pour explorer et mieux comprendre son rôle dans les conditions physiologiques et pathologiques. En effet, diverses isoformes ont été découvertes au fil des années et une altération d'AICD est présente dans la MA (Bukhari et al. 2017).

i. Fonctions physiologiques

Identifié en l'an 2000 par l'équipe du Dr Passer (Passer et al. 2000), AID ou AICD est un fragment de 6.5 kDa correspondant au domaine intracellulaire de la β APP. Ce fragment existe sous huit isoformes différentes (AICD Jcasp, 31,37, 48, 50, 51, 57, 59) dont les plus abondantes sont AICD 50 et AICD 51 (Bukhari et al. 2017). Ces deux formes résultent de la coupure de la γ -sécrétase sur les sites ε , lui-même modulé par l'ubiquilin-1 en stabilisant les présénilines (Viswanathan et al. 2013). En effet dans des cellules SH-SY5Y, une surexpression de l'ubiquilin-1 aboutit à une hausse de la présence d'AICD. Comme dit précédemment les voies canoniques sont responsables de la formation de ce peptide. Cependant, la plus grande partie de sa synthèse a pour origine le C99 situé dans les compartiments endosomaux, soit la

voie amyloïdogénique (Flammang et al. 2012). De plus, l'AICD formé par cette voie semble être plus stable et transcriptionnellement actif (Belyaev et al. 2010 ; Goodger et al. 2009). Selon plusieurs articles, AICD démontre une certaine instabilité et une dégradation rapide dans le cytosol par des enzymes de dégradation connues pour A β . Les IDEs (enzymes dégradant l'insuline) mais aussi la voie protéasomale et la cathépsine B dans les lysosomes jouent un rôle clé dans l'élimination de ce fragment (Buoso et al. 2012 ; Gersbacher et al. 2013). Il faut noter que des phosphorylations sur huit sites différents (Y,T,S) procurent une certaine stabilisation de l'AICD (Bauer et al. 2011). Un autre facteur affecte sa dégradation, l'interaction protéine-protéine. En effet, sa liaison avec ses partenaires tels que FE65 ou FOXO débouche par son insertion dans le noyau pour agir sur l'expression de divers gènes. Dans le cas de FOXO, une étude montre qu'en présence d'un stress oxydatif, les deux protéines interagissent et déclenchent l'expression de gènes pro-apoptotiques (X. Wang et al. 2014). Pour interagir avec ces protéines, AICD dispose de motifs très conservés entre les espèces : YENPTY, YTSI et VTPEER (Figure 20). La séquence YENPTY est responsable de l'interaction avec les protéines adaptatrices présentant des domaines SH2 ou PTB et de l'endocytose médiée par la clathrine. YTSI a un rôle crucial dans le trafic et la dégradation de la β APP (Bukhari et al. 2017). En ce qui concerne le dernier motif, il est particulièrement impliqué dans la MA. En effet, la phosphorylation de la Thréonine⁶⁶⁸ modifie la conformation de l'hélice α d'AICD et altère les interactions protéiques avec le motif YENPTY (détaillée dans la partie « Toxicité de l'AICD »). Les différents rôles d'AICD restent encore à éclaircir cependant, via des études *in vivo*, l'association de FE65, TIP60 et AICD forme un complexe transcriptionnel actif (AFT) soulignant un rôle physiologique d'AICD dans la traduction et la modulation de la transcription génique, particulièrement dans le développement et la plasticité cérébrale. A ce jour, 38 gènes cibles d'AICD ont été identifiés (Gsk-3 β , NEP, Cyclin D, Klotho...) et leurs dérégulations sont associées à diverses maladies telles que le cancer, la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer (Bukhari et al. 2017; Goiran et al. 2018; H.-S. Kim et al. 2003; von Rotz 2004).

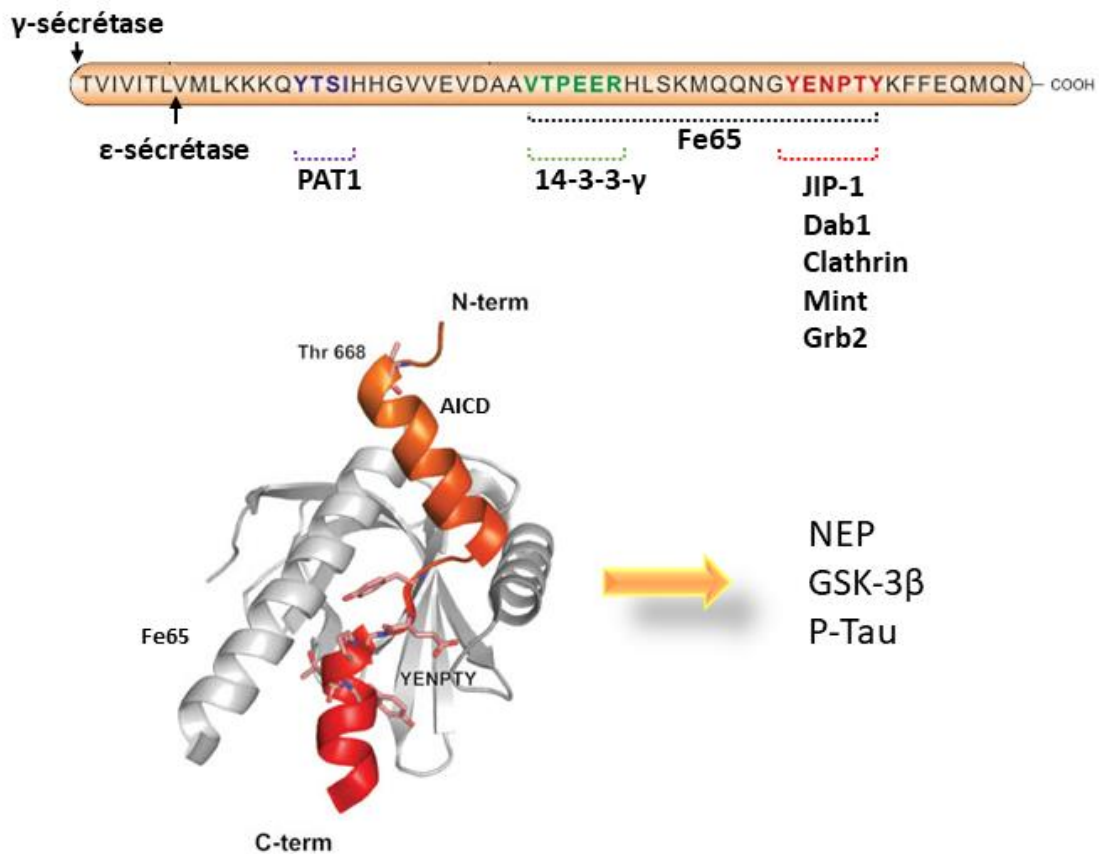


Figure 20: Interaction d'AICD avec les protéines adaptatrices (Inspirée de Grimm et al. 2013 ; Radzimanowski et al. 2008). La séquence de l'AICD comporte trois motifs permettant la liaison avec les protéines adaptatrices, essentiels pour la transcription des gènes. Dans le cas de Fe65, le domaine PTB et le motif YENPTY permettent de stabiliser les hélices α . Grâce à Tip60, plusieurs laboratoires ont révélé un effet sur l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau, sur la NEP et sur GSK-3 β dans la MA.

ii. Toxicité de l'AICD

Son rôle dans la MA est encore discuté, en raison de ses cibles et de ses multiples sites de phosphorylations induisant des conclusions controversées. En effet, en prenant comme exemple la phosphorylation de la thréonine 668, on constate une augmentation de sa présence dans les cerveaux MA et un lien avec les transports antérogrades de vésicules cargos, l'extension des neurites et la régulation de l'interaction de la β APP avec FE65. Néanmoins, dans des expériences *in vitro* et *in vivo*, des équipes s'opposent sur l'effet bénéfique ou délétère

de cette phosphorylation. La 1^{ère} observation rapporte que la pT⁶⁶⁸ promeut le clivage de la β APP en peptide amyloïde (Cruz et al. 2006). A l'inverse, d'autres laboratoires révèlent que cette phosphorylation inhibe le clivage γ -sécrétase et donc diminuerait le niveau d'A β (Feyt et al. 2007). Plus récemment encore, l'équipe du Dr Bukhari (Bukhari et al. 2016) démontre que la pT⁶⁶⁸ réduirait l'aire des plaques amyloïdes via la réduction de la génération des « sphères nucléaires » (càd : regroupement des différentes protéines permettant la transcription des gènes). Les phosphorylations médiées par CDK5, CDC2, GSK-3 β , JNK entraîneraient donc des interversions de conformation d'AICD créant des modifications de son amarrage, de son transport et de son interaction/modulation avec ses cibles dans la cellule (Tamayev, Zhou, et D'Adamio 2009). Egalement, AICD produit spécifiquement dans les compartiments endosomaux semble agir comme facteur de transcription. En effet, une étude montre que sa formation à partir de la membrane plasmique ne permet pas sa translocation dans le noyau, vu son court temps de demi-vie (Konietzko 2012). Dans le cas de la MA, l'augmentation de l'activité de BACE1 cause une augmentation de la production d'A β mais aussi une augmentation du signal d'AICD dans le noyau (Vingtdeux et al. 2007). Des souris transgéniques exprimant AICD et FE65 révèlent une augmentation de l'activité de GSK-3 β ainsi que des marqueurs pathologiques tels que l'hyperphosphorylation et l'agrégation de Tau (Ryan et Pimplikar 2005). Par ailleurs, AICD module l'homéostasie calcique intracellulaire (Yun-wu Zhang et al. 2005) et la surexpression de ce fragment semblent altérer les oscillations du réseau hippocampique via des perturbations des canaux calciques, potassiques et des récepteurs NMDA (Pousinha et al. 2019). Au sein de mon laboratoire, nous avons pu mettre en évidence l'implication d'AICD sur l'activité de la néprilysine (enzyme essentielle à la dégradation d'A β), sur l'expression et l'activité de p53 et indirectement sur le complexe γ -sécrétase en agissant sur la transcription de PEN 2 (J. Dunys et al. 2009 ; Julie Dunys et al. 2007 ; Pardossi-Piquard et al. 2006) ainsi que sur la mitophagie via PINK1 (Frédéric Checler, Goiran, et Alves da Costa 2017). En 2005, le Dr Pardossi-Piquard a prouvé qu'AICD est capable de moduler la néprilysine (Beckett et al. 2012 ; R. Pardossi-Piquard et al. 2006a; Raphaëlle Pardossi-Piquard et al. 2007) en utilisant des cellules KO PS^{-/-}. L'équipe du Dr Turner A.J a renforcé ce résultat par ChiP, en montrant une liaison directe entre AICD et le promoteur de la néprilysine (Belyaev et al. 2009). En parallèle, mon laboratoire d'accueil a découvert l'action d'AICD sur l'apoptose via la régulation de p53 (Alves da Costa et al. 2006). Pour finir les travaux du Dr Goiran T (Goiran et al. 2018) démontrent qu'avec les deux modèles *in vivo* surexprimant AICD (3xTg-AD en présence ou absence du D6 et AAV-NLS-AICD), ce

fragment était capable d'agir sur la mitophagie via PINK1 et qu'une boucle de rétrocontrôle était présente entre PINK1, Parkin, le complexe γ -sécrétase et AICD.

(d) Les peptides amyloïdes : $A\beta_{40}$ et $A\beta_{42}$

Peptide soupçonné d'être impliqué dans la MA depuis 1906 mais toujours très discuté : le peptide $A\beta$. Malgré sa présence dans les plaques, les multiples études et l'hypothèse amyloïde, beaucoup de chercheurs se posent toujours des questions sur le rôle de ce peptide et sa réelle implication dans la pathologie. En effet depuis peu, la recherche a découvert que l' $A\beta_{1-40/42}$ ne représentait qu'un pourcentage infime du dépôt amyloïde. Il est constitué principalement de formes $A\beta$ tronquées en sa région N-terminale (« développé dans la partie formes tronquées »). $A\beta$ est aussi retrouvée sous des formes tronquées en sa région C-terminale ($A\beta_{24-34-37-38-39}$) mais leurs rôles sont assez peu identifiés à part pour deux d'entre elles : $A\beta_{24}$ et $A\beta_{34}$ (développé dans la partie 3.4.i).

i. Fonctions physiologiques des peptides amyloïdes

Ce fragment a longtemps été considéré comme néfaste mais à présent, divers travaux ont révélé que le peptide $A\beta$ possède de multiples rôles physiologiques essentiels. Le peptide amyloïde est physiologiquement formé à partir de la β APP et des sécrétases énoncées précédemment (Haass et al. 1993 ; Shoji et al. 1992). La production d' $A\beta$ s'effectue dans le cerveau mais aussi dans les organes périphériques tels que les reins ou les muscles squelettiques. Dans les cerveaux sains, l'activité neuronale augmente le trafic de la β APP et déclenche la libération d' $A\beta$ à des concentrations atteignant le picomolaire. Physiologiquement $A\beta$ serait capable d'intercepter les pathogènes microbiens, de protéger contre certaines formes de cancer ainsi que contre les lésions cérébrales, d'éviter la perte de l'intégrité de la BHE et d'agir sur la neuroplasticité et l'apprentissage. Par de nombreuses études, $A\beta$ est considéré comme un peptide antimicrobien (AMP). En effet, dans des conditions *in vitro* mais aussi *in vivo*, $A\beta$ ralentit la prolifération de plusieurs champignons et microbes. Le papier du Dr Soscia révèle que la croissance de « *Candida albicans* » est inhibée dans des homogénats de cerveaux humains MA que des personnes saines. Même si cette preuve est indirecte et aussi renforcée par une autre équipe en 2016, l'argument confirmant l'effet d' $A\beta$ a été dévoilé, *in vivo*, par

l'équipe du Dr Kumar. Des techniques de microscopie électronique et d'immunohistochimie témoignent qu'A β piège l'ensemble des pathogènes dans un maillage d'A β fibrillaire (Bourgade et al. 2015 ; Kumar et al. 2016 ; Soscia et al. 2010). Cette fonction antimicrobienne est aussi retrouvée dans le sperme humain. Une corrélation entre un faible niveau d'A β fibrillaire et une réduction de la fertilité a été trouvée. L'A β fibrillaire sert de filtre pour éliminer les spermatozoïdes de mauvaise qualité et permettre une meilleure fertilisation.

Un autre rôle tout de même plus spéculatif, est la protection d'A β contre certaines formes de cancer. Une corrélation inverse existe entre les patients Alzheimer et les cancers (W.-S. Jin et al. 2017). De nombreuses études montrent que des patients atteints d'un cancer ont une tendance moins importante à développer la MA (Kucheryavykh et al. 2019 ; Pavliukeviciene et al. 2019). A contrario dans une méta-analyse, les personnes effectuant des essais cliniques avec des inhibiteurs γ -sécrétases sont associées à une augmentation du risque de développer un cancer de la peau. Même si les essais cliniques n'établissent pas le rôle actif d'A β en tant que suppresseur de tumeur, plusieurs expériences dans des modèles *in vivo* et *in vitro* indiquent qu'A β est capable d'inhiber la croissance tumorale. En effet, des cellules de glioblastome humain contenant le peptide A β manifestent une réduction de leur prolifération. Par imagerie bioluminescence (H. Zhao et al. 2009), les auteurs constatent l'effet inhibiteur d'A β sur la prolifération des cellules U87-L, MDA-MB23 I-L et B16F-L au moment du remplacement du milieu de culture par un milieu appartenant aux cellules 7W, HEK-swe et SH-swe (cellules sécrétant de l'A β dans le milieu). Cette hypothèse a été de nouveau confirmée grâce à l'équipe du Dr Paris et par la technique de xénogreffe. Les souris « nude » ont été injectées en sous cutanée avec une matrigel contenant du bFGF ou des cellules tumorales puis elles ont reçu plusieurs injections en intrapéritonéale d'A β _{1-40/1-42} (Daniel Paris et al. 2004, 2005). Après plusieurs jours, ils ont observé une diminution de la formation des vaisseaux, de l'invasion cellulaire et une réduction de moitié du volume tumorale. Plus récemment, cette équipe en Floride révèle aussi un défaut de croissance tumorale (40 à 50%) dans des modèles murins « Alzheimerisés » (D. Paris et al. 2010). L'ensemble de ces résultats suggère une implication de ce peptide, cependant le rôle exact et le mécanisme restent toujours non résolus.

De manière plus certaine, A β agit sur l'intégrité de la BHE. Effectivement, A β scelle les fuites présentes dans la barrière hémato-encéphalique et cette fonction semble s'accroître avec l'âge. Chez des patients atteints de MA, les plaques contiennent des protéines sanguines telles que l'albumine ou les IgGs. Ces protéines sont habituellement étrangères au cerveau mais sa liaison avec l'hémoglobine via le fer, conforte l'idée qu'A β soluble se lie à ces protéines afin

d'éviter leur propagation à travers le neuropile. D'autres observations ont montré que les plaques des patients MA (Carrano et al. 2011) sont toutes associées avec un capillaire et que la perméabilité de la BHE est poreuse avec l'âge dans l'hippocampe humain (Montagne et al. 2015). Cette perméabilité est encore plus prononcée chez les individus avec un MCI que chez les personnes saines (Hartz et al. 2012). Les essais cliniques confirment ce rôle lors de l'utilisation de produits pharmacologiques ciblant le peptide A β . En effet, le Bapineuzumab ou l'Aducanumab révèlent une incidence forte d'ARIA (Imagerie anormale liée à l'amyloïde) avec pour les doses les plus fortes, œdème et micro-hémorragie (Boche et al. 2008). Une étude travaillant sur un modèle de microcèbe âgé qui présente une accumulation d'A β endogène permet de comprendre et de confirmer l'action des produits pharmacologiques (Cai et al. 2018). Malgré une amyloïdose non sévère, l'immunisation contre A β_{42} entraîne une augmentation des dépôts de fer au niveau du plexus choroïdien et des microhémorragies au cours du vieillissement. Globalement, l'ensemble des études conforte l'action bénéfique d'A β (à concentration physiologique) sur l'intégrité de la BHE au cours du vieillissement.

De manière surprenante, on dénote une relation étroite entre la production d'A β et la formation de plaques lors de lésions cérébrales traumatiques. Par des techniques d'imageries cérébrales, les patients présentant des lésions traumatiques ou ischémiques dans une structure particulière montrent également une augmentation d'A β dans cette zone (Jendroska et al. 1995; Jendroska, Hoffmann, et Patt 1997). Cette accumulation semble être transitoire en réponse à un traumatisme et des articles révèlent un niveau élevé de la β APP et d'A β après la survenue d'une lésion. A β semble même être nécessaire à la réparation d'un cerveau ayant subi un traumatisme et que des injections d'A β s dans des souris déficientes en BACE améliorent leurs performances motrices. Cependant il faut souligner que l'ajout d'A β s dans des souris sauvages exacerbe les défauts moteurs, cela suggère que la concentration d'A β permettant cet effet est importante. La hausse de l'expression d'A β a été étudiée entre autre, après une lésion de la corde spinale dans des souris KO BACE ou avec des inhibiteurs de la γ -sécrétase (Pluta et al. 2013, 2019). Dans ces conditions, les souris développent plus de dommages de la substance blanche et de déficits moteurs (Koike et al. 2012). Étonnamment dans des modèles de SEP (sclérose en plaque), l'ajout d'A $\beta_{40/42}$ atténue la paralysie motrice, réduit l'activation des lymphocytes et la production de cytokines pro-inflammatoires dans le sang. L'ensemble de ces travaux témoigne de l'effet bénéfique d'A β sur les lésions avec une action protectrice dépendante de la concentration et de l'agrégation.

Cependant la fonction la plus reconnue est sans doute le rôle d'A β dans l'activité synaptique, nécessaire pour l'apprentissage et la plasticité cérébrale (Townsend et al. 2006). En

effet, A β agit sur les neurones pré-synaptiques en augmentant la probabilité de libération des neurotransmetteurs dans la fente synaptique. Comme dans la plupart des fonctions physiologiques d'A β , l'amélioration de la plasticité et de la consolidation de la mémoire n'est possible qu'à une concentration faible d'A β et semble éphémère. L'application de peptides synthétiques de l'ordre du picomolaire améliore la LTP dans des souris n'ayant pas d'A β endogène. Plus précisément, A β induit la neuro-plasticité en se liant avec les récepteurs acétylcholines nicotiques (α 7nAChRs) ou en stimulant les récepteurs glutamatergiques (Varga et al. 2014). La liaison d'A $\beta_{40/42}$ avec les α 7nAChRs a permis de mettre en évidence une augmentation du flux calcique dans des synaptosomes hippocampiques et l'inhibition des peptidases (Thiorphan) telle que la NEP, sert à améliorer le recyclage des vésicules synaptiques (Mura et al. 2012 ; Puzzo et al. 2008). Cet effet sur le recyclage des vésicules serait dû à l'homodimérisation de la β APP et de la voie signalétique Gi/o, selon l'équipe du Dr Lazarevic. Effectivement en testant le Thiorphan ainsi qu'A $\beta_{40/42}$, l'article témoigne du rôle hormétique du peptide amyloïde dans la modulation du recyclage des vésicules synaptiques avec l'implication du Ca $^{2+}$, de CDK5 et de la calcineurine (Hascup et Hascup 2016; Lazarevic et al. 2017).

ii. Pathogénicité d'A β s

Malgré de nombreuses recherches depuis 40 ans, la pathogénicité d'A β est toujours incertaine. Les mutations FAD supportent l'idée qu'A β a un rôle dans la pathologie via l'augmentation du nombre de plaques et l'augmentation de la production d'A β_{42} chez les patients. Le simple ajout de l'isoleucine et de l'alanine, les deux acides aminés C-terminaux différenciant A β_{40} et A β_{42} , confère à A β_{42} des propriétés cliniques, biophysiques et biologiques distinctement différentes d'A β_{40} . L'étude cristallographique indique que les résidus 15 à 42 adoptent une structure en feuillet croisé de type « fer à cheval » avec une partie hydrophobe. Cette organisation dénote sa toxicité (Bag et al. 2016) et sa propension à l'agrégation, hautement représentée dans les plaques amyloïdes de patients MA. Au-delà d'une certaine concentration et selon sa conformation, A β est considérée comme neurotoxique. Selon certains chercheurs, A β perturbe les fonctions synaptiques et entraîne une neurotoxicité conduisant à la perte neuronale. Plus précisément, ce peptide jouerait sur l'internalisation des vésicules synaptiques ainsi que des récepteurs post-synaptiques, contribuant au défaut de neurotransmission. Cependant, beaucoup de controverses existent dans la communauté

scientifique car depuis les années 90, plusieurs articles ont prouvé qu'il n'y avait pas réellement de corrélation entre les plaques amyloïdes et les déclin cognitifs mais il est important de distinguer la toxicité du peptide A β de celui des plaques amyloïdes. La compréhension du rôle précis du peptide amyloïde semble donc être plus complexe. Actuellement, l'hypothèse de son effet délétère se porte plus sur la diversité et l'oligomérisation d'A β s (développé juste après). Un assemblage variable (Güntert, Döbeli, et Bohrmann 2006) des différentes formes d'A β s solubles en oligomère lui confère des propriétés neurotoxiques mais la nature exacte de son agrégation et les mécanismes touchés restent toujours à élucider.

iii. Qu'en est-il des formes oligomères d'A β

De nos jours, la synaptotoxicité est plus en lien avec les formes oligomériques d'A β avec des concentrations atteignant le nanomolaire (Cline et al. 2018 ; Reiss et al. 2018). Très rapidement, des travaux démontrent que l'A β oligomérique (A β o) extrait de patient MA entraîne une réduction de la LTP et une augmentation de la LTD sur des coupes hippocampiques de souris. L'hypothèse de l'A β o et sa relation avec la pathologie ont été fondées à partir de 1998. Les propriétés physico-chimiques du peptide amyloïde jouent un rôle central dans son association avec de multiples partenaires mais aussi avec diverses autres formes d'A β s de tailles différentes. De multiples études témoignent de l'importance du rôle de l'A β o dans la pathogénicité (Lambert et al. 1998). En effet malgré l'absence de plaques amyloïdes, des patients MA et des modèles murins ou rats ont permis d'établir qu'A β o était présent de manière élevée dans le LCR, qu'il corrélait parfaitement avec les dysfonctions cognitives et que des anticorps contre les formes oligomériques reversaient le phénotype. Dans le cas de la mutation Osaka (APP E693Del) par exemple, les souris ne présentent pas de plaques amyloïdes mais possèdent un niveau très élevé d'A β o dans le LCR (Nishitsuji et al. 2009).

Pour mieux comprendre le rôle d'A β o, plusieurs techniques d'agrégation ont été développées mais cela a amené beaucoup de controverses et d'interrogations sur le rôle exact d'A β o dans la MA. L'A β ₄₂ synthétique s'agrège rapidement à faible concentration puis s'accumule en pré-plaque sur du tissu cérébral mais peut causer aussi des artéfacts expérimentaux, comme par exemple en présence de SDS (Lesné 2013). Une certaine prudence sur la méthode de préparation de l'A β o, la dose et le modèle utilisés doivent être pris en compte pour analyser les résultats traitant de ce sujet. Cependant, les résultats supportent l'idée que les déclin cognitifs sont les conséquences des dommages cellulaires induits par l'A β o. Dans un

premier temps via des techniques ultra-sensibles tel que le BioBarcode (nouvelle génération d'Elisa), on a pu observer que le niveau d'A β est 30 fois plus important dans le LCR chez des patients MA que chez des personnes saines (D. G. Georganopoulou et al. 2005 ; Dimitra G. Georganopoulou et al. 2005; Penke, Szűcs, et Bogár 2020).

De nombreuses questions ont donc émergé de cette hypothèse : Quelles espèces d'A β composent ces formes oligomériques ? Comment et par quel moyen l'A β agit-il sur une cellule ? Toutes les cellules neuronales sont-elles touchées par cet agrégat ou seulement un seul type cellulaire et y a-t-il une propagation de la pathologie médiée par ces oligomères ?

Au niveau cellulaire, A β provoquerait la pathologie Tau, les défauts de transports axonaux, le stress oxydatif ainsi que le stress réticulaire, la résistance à l'insuline, la neuro-inflammation, les défauts cholinergiques... Sa toxicité semble dépendre de sa structure quaternaire (Decock et al. 2016), du poids moléculaire et de sa réactivité aux anticorps. Globalement, les études divisent en deux sous-populations les formes oligomériques en fonction de leur taille: les HMW (High molecular weight= haut poids moléculaire) ou A β de ≥ 50 KDa et les LMW (Low molecular weight= faible poids moléculaire) ou A β inférieurs à 50 KDa. Les HMW se lient avec des récepteurs cellulaires tels que PrPc conduisant à une production de ROS ainsi qu'au défaut de mémorisation. A l'inverse, les LMW ne semblent pas induire d'effets particuliers même s'ils sont présents en dimère ou trimère dans les cerveaux de patients ainsi que dans les modèles murins (W. Hong et al. 2018).

Par des techniques de spectrométrie de masse pour analyser les espèces présentes dans les cerveaux MA, une étude révèle que 73% de l'A β correspond à des formes tronquées dans la région N-terminale et 30% à des formes tronquées dans la région C-terminale. Les formes N-tronquées jouent en partie leur rôle de pathogénicité en stabilisant les complexes oligomériques d'A β_{42} (développé dans la partie « formes particulières : A β Pyroglutamate 3-x »). En effet, une équipe révèle même que les formes pE A β sont omniprésents dans les cerveaux MA (Dunkelmann et al. 2018). Malgré ces découvertes sur l'agrégation en oligomères, des imprécisions existent concernant son assemblage. De nombreuses équipes énoncent une hypothèse de classification d'assemblage d'A β selon leur rôle : « on-pathway » avec la formation de fibrille ou « off-pathway » en induisant une toxicité. Cependant, d'autres hypothèses sont encore proposées avec un modèle de noyau fibrillaire composé d'A β ou de nucléation primaire et secondaire dont les plaques seraient des réservoirs qui libéreraient de l'A β toxique dans certaines conditions toujours inconnues (Matsumura et al. 2011).

La toxicité d'A β o vient de son attachement à la membrane plasmique ou via la liaison à des récepteurs membranaires. En effet, la formation des pores et le recrutement d'A β dans les radeaux lipidiques sont attribués principalement aux formes oligomériques d'A β et/ou sont composés d'A β tronquées. Le cholestérol et le ganglioside GM1 semblent améliorer l'insertion à la membrane et l'interaction physio-chimique de l'A β o avec les radeaux lipidiques (Evangelisti et al. 2013). La formation de ces pores induit un flux calcique à l'intérieur de la cellule provoquant une synaptotoxicité. Dans le cas des liaisons d'A β o avec les récepteurs membranaires, de nombreuses protéines sont candidates. Les mécanismes les plus étudiés, sont l'interaction d'A β o avec les récepteurs PrPc et NKA α 3 (DiChiara et al. 2017 ; Ohnishi et al. 2015). Dans de nombreux modèles, des équipes observent la capacité de liaison de PrPc et d'A β o et l'accumulation dans les endosomes et les lysosomes. Cette interaction stimule la protéine Fyn via l'activation du récepteur mGluR5 (Beraldo et al. 2016). La stimulation de Fyn est connue pour phosphoryler Tau ainsi que la sous-unité NR2B du récepteur NMDA. Cette cumulation d'évènements en intracellulaire expliquerait la neuro-toxicité d'A β o et son implication dans la MA. Plus précisément, l'activation du NMDAR favorise la libération de Ca²⁺ menant au stress du RE, à une dysfonction mitochondriale, à une astrogliose et à de l'apoptose. Alors que pTau induit dans les neurones serait sécrété par voie exosomale, suggérant un mécanisme de propagation de la pathologie Tau (G. Lee 2004). Par ailleurs Fyn créerait un complexe avec Pyk2, kinase focale d'adhésion régulant la plasticité synaptique (European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al. 2013). Dans le cas de la liaison de NKA α 3 et d'A β o, l'équipe du Dr Hoshi démontre une diminution de l'activité ATPasique déclenchant une entrée de Ca²⁺ via les canaux calciques voltage-dépendants et mitochondriaux (DiChiara et al. 2017 ; Ohnishi et al. 2015). In fine, ces perturbations se traduisent par des défauts synaptiques tels que la LTP (énoncé précédemment) et par de la mort neuronale. L'action de l'A β o semble être impliquée dans les 3 différents types cellulaires : neurones, astrocytes et microglies. Dans le cas des cellules gliales, l'A β o induit l'activation des microglies et astrocytes. Dès une concentration atteignant le picomolaire, l'A β o déclenche une libération forte de Ca²⁺, la génération de ROS et perturbe la voie insuline/Akt/EAAT ainsi que l'expression des transporteurs glutamatergiques dans les astrocytes. L'A β o dans les microglies, quant à lui, serait chimio-attractant et déclencherait un phénotype pro-inflammatoire et une aberration de la voie TNF.

iv. Dégradation des peptides amyloïdes

A β dispose de plusieurs voies de clairance (Xin et al. 2018b) : le transport à travers la BHE, la protéolyse enzymatique, la dégradation protéasomale ou autophagique et la phagocytose microgliale.

Le transport à travers la BHE (R. Deane et al. 2009) permet de réguler de manière rigoureuse la concentration d'A β dans le liquide interstitiel, principalement par le biais des récepteurs RAGE et LRP1. L'A β libre est séquestré par un ensemble de molécules telles que ApoE, la clusterine (CLU=ApoJ), l'albumine ou α 2M. Ces complexes vont par la suite se fixer sur les récepteurs RAGE ou LRP1 pour permettre la transcytose du peptide amyloïde à travers la BHE. Dans des conditions physiologiques, LRP1 séquestre 70 à 90% de l'A β dans le plasma humain en se liant sur la région C-terminale du peptide. LRP1 appartient à la famille des récepteurs LDL, jouant un rôle majeur dans le transport des lipoprotéines comme par exemple ApoE. Dans la MA, ApoE et ApoJ présentent des variants identifiés comme facteurs de risque de la pathologie (développé dans la partie « facteurs de risques génétiques »), liés entre autre par une baisse d'efficacité de la clairance d'A β . En effet, les études ont pu montrer qu'ApoE3 a une meilleure affinité de liaison avec l'A β qu'ApoE4 (Pflanzner et al. 2011; Xu, Tan, et Yu 2015; Z. Zhao et al. 2015). L'état de lipodation d'ApoE4 modifie sa conformation stérique et serait la raison de la perte de contact avec A β en perturbant ainsi la clairance dépendante de LRP1. En ce qui concerne le récepteur multi-ligand RAGE, l'accumulation d'A β pathogénique dans la MA augmente son expression. L'interaction entre le peptide amyloïde et RAGE provoque des troubles neurovasculaires de la MA en altérant les réponses inflammatoires, l'apoptose dépendante de NF-KB et la transcytose de l'A β circulant (Rashid Deane et al. 2008; Rebeck et al. 1995; Sagare et al. 2007; S. D. Yan et al. 1996).

Le processus de protéolyse d'A β dans l'espace extracellulaire est un autre mécanisme important pour l'équilibre de la production et l'élimination d'A β . Plusieurs enzymes ont la faculté de dégrader le peptide A β : la néprilysine (NEP ou MME), l'IDE, la plasmine, les MMP2/9, l'ACE, l'ECE, FOLH1, BACE 2 et la cathepsine B. L'ensemble des études montrent que la combinaison des activités endo et exopeptidases reflètent la variété d'A β dit « secondaire » présent dans les différents compartiments cellulaires. Dans le contexte actuel je développerai seulement le rôle et les découvertes sur la néprilysine, même si un résumé de

l'action de chacune des enzymes impliquées dans la dégradation du peptide A β est présent dans le **Tableau 5** (Sikanyika et al. 2019).

ADEs (enzymes dégradant A β)	Etudes dans la MA	Sites de clivages d'A β	Références
NEP	L'utilisation du Thiorphane, inhibiteur de la NEP-1 montre une augmentation du dépôt d'A β dans les rats. KO NEP-2 augmente de 1.5 fois la charge en A β	A ₂ , E ₃ , R ₅ , G ₉ , V ₁₂ , L ₁₇ , V ₁₈ , K ₂₈ , G ₂₉ , A ₃₀ , G ₃₃	(Eckman, Reed, et Eckman 2001 ; Hafez et al. 2011)
ACE	La surexpression d'ACE dans des modèles murins révèle une baisse de charge en A β et en plaque amyloïde.	D ₇ , E ₁₁ , H ₁₃ , V ₁₈ , E ₂₂ , S ₂₆ , K ₂₈ , L ₃₄	(K. E. Bernstein et al. 2014)
ECE	Le phosphoramidon cause une augmentation du dépôt d'A β dans les cellules neuronales.	K ₁₆ , L ₁₇ , F ₁₉	(Eckman, Reed, et Eckman 2001)
IDE	La surexpression de BRI 2 permet une augmentation d'IDE et une diminution du niveau d'A β dans les APP/PS1	V ₁₂ , H ₁₃ , V ₁₈ , F ₁₉	(Kilger et al. 2011)
MMP	Les inhibiteurs de MMPS augmentent le niveau d'A β dans le liquide interstitiel de souris transgéniques APP	K ₁₆ , A ₃₀ , L ₃₄	(Yin et al. 2006)
Plasmine	Un KO PAI-1 améliore le phénotype par une réduction de la charge d'A β dans un modèle Alzheimer	R ₅	(R.-M. Liu et al. 2011)
Cathepsine B	Effet positif de la Cat B par une réduction du dépôt d'A β dans les souris hAPP.	H ₁₃ , H ₁₄ , F ₁₉	(Mueller-Steiner et al. 2006)

Tableau 5 : Les enzymes impliquées dans la protéolyse d'A β .

En effet, la néprilysine (NEP) est l'enzyme la plus caractérisée pour la dégradation du peptide A β . Au départ nommée enképhalinase pour sa forte affinité avec l'enképhaline, la NEP montre un intérêt majeur dans la MA (Feygina, Katrukha, et Semenov 2019; Roques et al. 1980; T. Saido et Leissring 2012). En effectuant des invalidations géniques pour cette enzyme ou par des approches pharmacologiques, il a été suggéré que la NEP représentait un régulateur endogène important pour A β puisqu'il a été observé une augmentation de plus de deux fois de l'expression d'A β ₄₀ et A β ₄₂ dans ces souris (Baranello et al. 2015; Madani et al. 2006; Yasojima et al. 2001). Inversement, une surexpression de la NEP dans des modèles murins transgéniques révèle une réduction de la charge d'A β dans le cerveau (Carpentier et al. 2002; Grimm et al.

2013; Leissring et al. 2003; Meilandt et al. 2009). Cette enzyme est une métallo-protéase à zinc de 97 kDa, transmembranaire de type II et clivant préférentiellement des peptides circulants. Au cours du vieillissement, l'expression de la NEP est réduite et plus particulièrement dans l'hippocampe (T. Saido et Leissring 2012). Cette baisse importante dans des zones tel que l'hippocampe pourrait représenter un facteur important au développement de la pathologie. Par ailleurs, au sein de mon laboratoire le Dr Pardossi-Piquard a mis en évidence une régulation de l'activité de la NEP par les constituants du complexe γ -sécrétase : la nicastrine et la préséniline ainsi que par l'AICD (R. Pardossi-Piquard et al. 2006a). Ces régulations sont forcément altérées dans le cas de malade Alzheimer et expliquerait sans doute les défaillances de l'activité de la NEP dans la pathologie. D'un point de vue thérapeutique, plusieurs composés ont été trouvés pour stimuler l'activité de la NEP tel que le polyphénol dans le thé vert, l'hormone humaine ainsi qu'un peptide extrait de venin, le K49-P1-20 (Feygina, Katrukha, et Semenov 2019; Sikanyika et al. 2019). Ce dérivé, touchant à la fois la NEP et l'ECE, montre une diminution de l'A β ₄₂ endogène dans le LCR de patient MA post-mortem. Malgré ces récentes découvertes, aucune drogue n'est encore développée en essai clinique pour la MA.

Les trois autres voies possibles pour l'élimination du peptide A β sont la phagocytose microgiale, la voie protéasomale et la voie autophagique. Les cellules microgiales appartiennent aux cellules myéloïdes de l'immunité innée (Y. Yu et Ye 2015). Comme déjà énoncé dans la partie 1.D.3, les microglies auraient un rôle phagocytaire sur le peptide amyloïde en internalisant les formes fibrillaires d'A β . Concrètement, l'A β est assimilé comme une DAMP (= danger associated molecule patterns) par les microglies. En d'autres termes, A β se fixe sur des récepteurs de surface tels que TLRs, FPR2 ou AGER (T. Jiang et al. 2013a, 2013b, 2014). Après l'interaction, la cellule déclenche une série de voies protéiques permettant la phagocytose ainsi qu'une réponse inflammatoire. Cependant l'équilibre entre la phagocytose et la réponse inflammatoire est vite altéré. Chez les patients MA, la clairance par les cellules microgiales est insuffisante et déclenche une aggravation en produisant des molécules pro-inflammatoires (TNF- α) et en perdant le contrôle de certaines chemokines et cytokines. En effet CX3CL1, TREM2 ou même IL-1 β permettent physiologiquement d'activer la phagocytose et de sécréter des cytokines anti-inflammatoires (Joaquín Merino et al. 2016; Kitazawa, Hsu, et Medeiros 2016; Y. Wang et al. 2015).

De manière générale, la survie cellulaire dépend d'une voie appelée « protéostasie » qui permet de contrôler la synthèse, la dégradation et le contrôle qualité des protéines. Lorsque

qu'une protéine est présente en trop grande quantité ou lorsqu'elle est mal repliée, la cellule déclenche deux principaux systèmes de dégradation qui sont : le système protéasome-ubiquitine (L. Hong, Huang, et Jiang 2014) et le système autophagique (Yuan Zhang et al. 2017). Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est un processus de dégradation comportant un enchaînement d'ubiquitination faisant intervenir 3 enzymes (E1, E2 et E3), suivie d'une fixation de la sous-unité protéasomale 26S pour la catalyse (L. Hong, Huang, et Jiang 2014). A partir de 1987, une relation entre le peptide A β et le protéasome a été dévoilée puisqu'une détection d'ubiquitine dans les plaques séniles a été trouvée. Malgré le fait que l'A β et le protéasome ne se situent pas dans les mêmes compartiments cellulaires, des expériences suggèrent qu'A β_{42} se diffuse du RE au cytosol et serait potentiellement substrat du complexe UPS (Gerakis et al. 2016; Lonskaya et al. 2014; Yuan Zhang et al. 2017). A partir de cultures primaires de neurones, l'inhibition de l'activité protéasomale par la lactacystine montre une baisse de la dégradation d'A β_{42} (Kienlen-Campard et al. 2008). Cependant, il existe un impact du peptide A β sur le complexe UPS en inhibant l'activité protéolytique. L'A β_{42} produit une augmentation de l'expression de l'enzyme E1, entraînant une hausse de protéines ubiquitynilées (Kaneko et al. 2012; Tank et True 2009; van Tijn et al. 2012). Des articles plus récents suggèrent que l'A β_{42} agrégée rentrerait en compétition avec les substrats naturels du protéasome 20S et l'inhibition de l'UPS causerait aussi des défauts de sécrétion des corps multi-vésiculaires (Gentier et al. 2015; McKinnon et Tabrizi 2014; S. Song et al. 2008). De manière plus précise, les enzymes du complexe UPS modulant le métabolisme d'A β (Parkine, E2-25K, UCHL1, DUB) sont dans l'ensemble altérées et affectent l'équilibre de dégradation d'A β mais aussi celui de Tau ([Figure 21](#)). Le système lysosomal-autophagique (ALS), quant à lui, révèle une accumulation du peptide A β et affecte aussi sa dégradation (Colacurcio et al. 2018 ; Uddin et al. 2018 ; Zare-shahabadi et al. 2015). Plusieurs facteurs de la voie autophagique tels que TFEB ou la Bécline 1 sont dérégulés dans la MA ce qui aboutit à un défaut de dégradation (Mputhia et al. 2019). Sans développer le mécanisme complet de l'autophagie ([Figure 9](#)), une équipe en 2014 observe clairement que TFEB promeut la clairance d'A β et la pathogénicité des plaques amyloïdes (Reddy et Oliver 2019b; Xiao et al. 2014). Des déficiences en Bécline 1 dans des modèles cellulaires ou murins entraînent un niveau élevé de la β APP, d'A β et de fragments C-terminaux (Yi-dan Zhang et Zhao 2015). Divers chercheurs pensent qu'A β pourrait être un régulateur de l'autophagie. De nombreuses approches pharmacologiques touchant la voie autophagique révèlent des améliorations dans l'apprentissage des souris ainsi qu'une baisse de la présence du peptide amyloïde. La rapamycine, l'arctigénine ou le Dimebon stimulent

l'autophagie dépendante des voies mTOR, ATG5 ou AMPK/RAPTOR et améliorent dans chacun des cas l'élimination du peptide A β (Zare-shahabadi et al. 2015b).

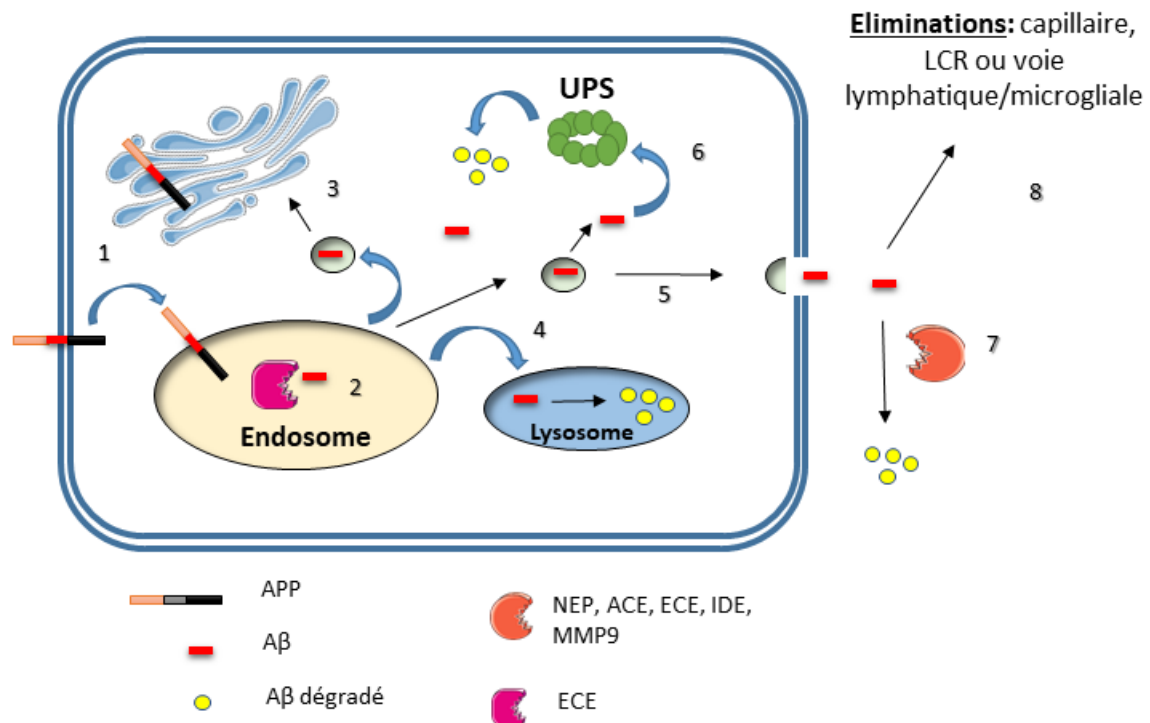


Figure 21 : Dégradation du peptide amyloïde (Inspirée de Baranello et al. 2015). La β APP n'ayant pas été clivée par l' α -sécrétase ou étant devenue non-fonctionnelle sera internalisée dans les endosomes, lieux où les catabolites délétères sont principalement formés (1). L'A β est dégradé par diverses voies de dégradation: via les enzymes de dégradation retrouvées dans les endosomes (2) ou dans la partie extracellulaire (7) après sécrétion de vésicules endocytaires (5), au travers de la voie UPS (6) ou par le compartiment lysosomal (4). Cependant, l'A β non dégradé peut-être recyclé au niveau de l'appareil de Golgi (3), drainé du cerveau en étant dirigé vers le LCR, les voies capillaires/lymphatiques ou phagocyté par les cellules gliales (8).

(e) Les peptides amyloïdes N-terminaux : $A\beta_{11-x}$ et $A\beta_{17-x}$

Discutés précédemment dans la partie α et β -sécrétase, les catabolites $A\beta_{11-x}$ et $A\beta_{17-x}$ sont générés par les sécrétases sur les sites β'/γ et α/γ , respectivement (T. C. Saïdo et al. 1996). De manière générale, l' $A\beta_{17-x}$ (p3) a été rarement étudié et ne montre pas de toxicité. Sa présence est assez faible dans les plaques ainsi que dans le LCR. Uniquement quelques articles mentionnent que ce peptide de 3 KDa contribue à la formation non congophilique des plaques diffuses dans le cervelet de patients DS (Down Syndrome) et dans certaines aires cérébrales de patients MA et qu'il pourrait être utilisé comme indicateur de MCI (Abraham et al. 2013). De plus, le rôle de ces fragments dans des mécanismes moléculaires ou dans une voie métabolique n'est toujours pas exploré étant donné le manque d'outils. Cette limitation conditionne grandement l'avancée dans ce domaine. Dans le cas d' $A\beta_{11-x}$, plusieurs équipes ont tout de même permis d'identifier BACE comme étant l'enzyme formant ce fragment, ainsi que sa localisation, la quantité retrouvée dans les plaques et ses caractéristiques d'agrégation (K. Liu et al. 2006). L'utilisation de la spectrométrie de masse chez des patients MA révèle que les formes $A\beta_{11-42}$ ou $A\beta_{pE11-42}$ représentent un pourcentage identique à celui de l' $A\beta_{1-42}$ (environ 18%) dans les plaques amyloïdes. L' $A\beta_{pE11-42}$ (Naslund et al. 1994) se localise principalement dans la partie « profonde » des cores des plaques séniles (Miravalle et al. 2005 ; Naslund et al. 1994). Chez des patients ayant la mutation V261I sur PSEN1, l'équipe du Dr Vidal observe une forte détection des formes $A\beta_{3-x}$ et $A\beta_{11-x}$ dans les plaques de type « cotton wool » (Sullivan et al. 2011). Grâce aux techniques d'immuno-empreintes et à la synthèse d'anticorps dirigés contre différents $A\beta$ tronqués en sa région N-terminale, plusieurs articles détectent les formes $A\beta_{3/11/17-x}$ dans le surnageant de cellules HEK APPWT surexprimant BACE1, dans les extractions de différentes aires cérébrales de patients MA ou DS et dans le LCR (Abraham et al. 2013; Ranaldi et al. 2013). Ces résultats argumentent sur l'effet toxique de l' $A\beta_{11/pE11-42}$ dans la pathologie MA. De nombreux autres articles attestent de cet effet délétère comme par exemple les articles des Drs Lee, Ancolio et Ranaldi. Ils décrivent dans différentes lignées cellulaires, l'augmentation accrue des formes $A\beta_{11-42}$ par des approches de mutations FAD sur l'APP ou de surexpression de BACE (E. B. Lee et al. 2003) en Western blot ou Elisa. Dans le LCR ou dans un enchaînement de fractionnements d'échantillons humains en post-mortem (MA, MCI ou DS), les résultats révèlent toujours la forte présence d' $A\beta_{11/pE11-42}$ dans le lobe temporal supérieur de la fraction TX (fraction au triton) mais on peut constater que le niveau de ce fragment est diminué dans le LCR de MCI (K. Liu et al. 2006). La dernière particularité

de ce fragment est sa capacité de fixation avec les autres formes d'A β ou avec le Cu²⁺ (Ancolio et al. 1999; J. Lee et al. 2014; Ranaldi et al. 2013). Le Dr Barritt identifie une association forte entre l'A $\beta_{11-40/42}$ et le cuivre. L'Histidine en position 13 du peptide A β procure un motif « NH₂-XxxXxxHis » proche du substrat naturel du cuivre, l'albumine. Lors de l'ajout d'un chélateur du Cu²⁺ (clioquinol), une amélioration de la toxicité et de la charge en plaque est visible dans des modèles MA (Barritt et Viles 2015; Barritt, Younan, et Viles 2017). Une étude constate que lors de la formation des fibres A β_{1-x} , l'A β_{11-40} interagit exclusivement avec l'A β_{1-40} et accélère la formation fibrillaire. Cette différence d'efficacité d'agrégation entre l'A β_{11-40} et l'A β_{1-x} , est sans doute due à la conformation en U ou en S du peptide A β_{1-x} , produite par le pont salin. Il est également suggéré que les formes 3/4-x d'A β sont impliquées dans la fibrillation.

5. Les fragments protéolytiques issus du clivage secondaire d'A β et leur implication dans la pathologie

(a) Formes tronquées en C-terminal

i. A β_{34}

Les rôles physiologique et pathologique du variant A β_{34} n'ont pas été jusqu'ici découverts. Grâce aux techniques de spectrométrie de masse, A β_{34} a été identifié dans le LCR de patients MA (Cabrera et al. 2018; Caillava et al. 2014; Julie Dunys, Valverde, et Checler 2018). Cependant, ce n'est en aucun cas une preuve d'implication de ce fragment dans la progression de la maladie. Avant de comprendre son rôle, les chercheurs ont étudié la formation d'A β_{34} dans des modèles cellulaires ou dans le LCR (Vandermeeren et al. 2001). En modifiant l'expression ou l'activité de BACE, on constate une modulation de la quantité d'A β_{34} . Dans le cas des articles des Drs Maddalena, Portelius ou Mattsson, on observe que l'inhibition de BACE1 par le LY2811376 ou l'AZ-20 révèle une baisse de l'A β_{34} à la fois dans les cellules et dans le LCR (Maddalena et al. 2004 ; Mattsson et al. 2012; Portelius et al. 2014). A l'inverse une surexpression de BACE augmente la production de l'A β_{34} à partir d'A β_{40} (Liebsch et al. 2019; Vassar et al. 2009). On constate aussi que la génération d'A β_{34} est réalisée à partir de l'A β_{40} et non à partir des β -CTFs et qu'elle est dépendante de la γ -sécrétase (Fluhrer et al. 2003; X.-P. Shi et al. 2003, 34). D'autres enzymes ont été décrites comme étant responsables du catabolisme d'A β_{40} en A β_{34} . En effet les MMPS (2,9) et la néprilysine (Hernandez-Guillamon et al. 2015; Kirabali et al. 2019; Marr et al. 2003) dégradent le peptide A β_{1-x} en A β_{34} , ce qui

permettrait de réguler le niveau d'A β toxique. A β ₃₄ semblerait avoir un effet protecteur en inhibant l'activation de la caspase-3 et la mort cellulaire (Caillava et al. 2014). Dans le cas d'études *in vivo*, la création d'anticorps ciblant l'A β ₃₄ permet de mettre en évidence la présence de ce fragment dans divers modèles murins ainsi que chez l'humain. Le marquage atteste une immuno-réactivité plutôt ponctiforme et présente autour des plaques, ce qui permettrait de considérer A β ₃₄ comme une espèce soluble et stable (Akerman et al. 2019).

ii. A β ₃₇, A β ₃₈ et A β ₃₉

De manière identique à la partie précédente, les peptides A β ₃₇, A β ₃₈ et A β ₃₉ ont été moins pris en considération, même si leur présence a été identifiée dans de nombreux LCR de patients souffrant de la MA (Reinert et al. 2016). A β ₃₈ semble même être la seconde forme d'A β la plus présente après l'A β ₄₀ avec une concentration proche de celle de l'A β ₄₂. Au niveau topographique cérébral, l'A β ₃₈ se retrouve principalement dans les parois de vaisseaux de personnes atteintes d'angiopathie amyloïde cérébrale (CAA) mais absent dans les plaques séniles (Mattson et al. 1992; Paik et al. 1998; Yoshimoto et al. 1995). Dans le cas de l'A β ₃₇ et de l'A β ₃₉ les marquages immunohistologiques dans le cerveau de patients MA, pour les formes familiales ou sporadiques, détectent une forte présence de ces fragments dans les vaisseaux méningés et parenchymateux. Dans les FAD, on en retrouve également dans les plaques séniles. Par des techniques de MALDI-TOF, les A β _{37/39} sont seulement détectés dans le cerveau de patients FAD et non pour les cas sporadiques (J. Wiltfang et al. 2002). La production de ces fragments correspond à un clivage successif de la γ -sécrétase (Figure 15), en enlevant des tripeptides ou en libérant le peptide GVVIA dans la région C-terminale d'A β _{40/42}. La production d'A β ₃₈ est influencée par des drogues NSAIDs telle que l'ibuprofène (Weggen et al. 2001). En effet, l'application de ces traitements dans des cellules CHO ou HEK affecte la production d'A β ₄₂ en favorisant la présence d'A β ₃₈. Les drogues moduleraient l'activité γ -sécrétase sans modifier l'activité cyclo-oxygénase et la voie Notch. Il est intéressant de noter que ces formes tronquées en C-terminal sont moins agrégeantes *in vitro*, moins synaptotoxiques dans les coupes hippocampiques et n'altèrent pas la toxicité et la fonction locomotrice des modèles drosophiles (Moore et al. 2018).

(b) Formes tronquées en N-terminal

i. $A\beta_{2-x}$

A partir des années 2000 de nombreuses équipes allemandes recherchaient à mettre au point des techniques permettant d'identifier de manière plus spécifique les différentes formes d' $A\beta$ tronquées en N-terminal (Jens Wiltfang et al. 2001). Grâce à la création de multiples anticorps spécifiques (1E8,13E9, pAb77), aux techniques d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse, les laboratoires ont pu discriminer les différents $A\beta$ (Sergeant et al. 2003). Le Dr Wiltfang révèle la présence de la forme $A\beta_{2-42}$ à la fois dans le LCR et dans les homogénats de cerveaux. On détecte plus d' $A\beta_{2-42}$ chez des patients atteints de MA que chez les personnes saines (Maler et al. 2007). Il montre également que la déficience en PS1 dans un modèle murin n'affecte pas la production de ce fragment à l'inverse de l' $A\beta$ total. Ce résultat dénote que la formation de l' $A\beta_{2-42}$ est indépendante de la γ -sécrétase et serait due à une autre enzyme. Par la suite, d'autres articles confirment la présence des formes $A\beta_{2-x}$ avec une baisse dans le LCR (Bibl et al. 2018; Bibl, Gallus, Welge, Esselmann, et Wiltfang 2012; Bibl, Gallus, Welge, Esselmann, Wolf, et al. 2012; Bibl, Gallus, Welge, Lehmann, et al. 2012) et une augmentation dans les homogénats de cerveaux (Savastano et al. 2015). Cette diminution d' $A\beta_{2-x}$ semble être spécifique de la MA et non de la FTD (démence fronto-temporale) où l' $A\beta_{1-38}$ serait altéré. Plus récemment, le Dr Savastano a observé la présence de l' $A\beta_{2-x}$ dans le core des plaques et dans les vaisseaux de deux modèles murins ainsi que dans des cas sporadiques de la MA. Pour trouver l'enzyme capable de détacher l'aspartyl en position 1, des équipes ont travaillé avec des inhibiteurs de BACE, d'APA ou des KO pour la Meprin β (Scharfenberg et al. 2019). On constate que l'inhibition de BACE ne modifie aucunement la formation de l' $A\beta_{2-x}$, à l'inverse les études sur APA et Meprin β montrent une augmentation de l' $A\beta$ entier (Schlenzig et al. 2018). De manière intéressante, on observe aussi que la Meprin β clive différemment selon l'acide aminé situé en amont de l'aspartyl. La leucine présente dans la mutation suédoise empêche la meprin β de générer la forme $A\beta_{2-40}$. En ce qui concerne leur fonction dans le développement de la pathologie, les $A\beta_{x-42}$ ($A\beta_{1/2/p3-42}$) améliorent la phagocytose à la fois dans les monocytes et les microglies. L'insertion de particules de polystyrène (Condic et al. 2014) couvert d' $A\beta_{x-42}$ déclenche une réaction pro-inflammatoire en réduisant IL-10 et la MSRI. Le Dr Sevalle témoigne indirectement que les formes $A\beta$ tronquées affecteraient la toxicité engendrée par la caspase 3. Une augmentation de l' $A\beta$ entier induirait un effet protecteur pour la cellule (Sevalle et al. 2009).

ii. $A\beta_{4-x}$

En poursuivant les recherches sur les formes tronquées du peptide $A\beta$, plusieurs équipes attestent de la forte présence d' $A\beta_{4-x}$ et d' $A\beta_{pE3-x}$ (développé dans le prochain paragraphe) dans les cerveaux humains MA. En regardant de plus près, l' $A\beta_{4-x}$ est localisé dans le core des plaques, en intra-neuronale et dans les CAA. Ce fragment n'est cependant pas retrouvé dans les plaques diffuses, dans d'autres maladies neurodégénératives et serait produit de manière précoce (Y. Bouter et al. 2013). Dès 2,5 mois, les espèces d' $A\beta$ commençant par le 4^{ème} ou le 5^{ème} acide aminé sont détectables dans les souris APP/PS1KI. Pour comprendre l'implication de ce fragment dans la pathologie les anticorps NT4X-167, AC 029-2 et fab ont été générés ainsi que le modèle murin transgénique pour le peptide $A\beta_{4-42}$: Tg₄₋₄₂ (Lopez-Noguerola et al. 2018 ; Sichler et al. 2019). Le Dr Antonios trouve que les anticorps NT4X et fab réduiraient le phénotype pathologique en diminuant la toxicité d' $A\beta_{4-x}$, les plaques amyloïdes et en améliorant la mémorisation dans les souris 5XFAD et Tg₄₋₄₂ (Antonios et al. 2013, 2015). De nombreux articles caractérisent le nouveau modèle murin Tg₄₋₄₂ (C. Bouter et al. 2019 ; Dietrich et al. 2018). Ce modèle montre bien des déficits cognitifs et moteurs (J. M. Wagner et al. 2019) avec une accumulation d' $A\beta$ en plaques, une diminution de la neurogénèse dans le gyrus dentelé et le SGZ (zone sous granulaire), une diminution de l'activité physique (sensation d'apathie) et une augmentation de la micro/astroglie (Wirhns et al. 2017). Un croisement entre ce modèle et le modèle TBA2 (spécifique de l' $A\beta_{pE3-x}$) provoque une augmentation plus importante de la perte neuronale, du déficit moteur et de l'accumulation d' $A\beta$ en intraneuronale (Lopez-Noguerola et al. 2018). Un autre croisement avec des souris KO NEP atteste de l'implication de la néprilysine dans la dégradation de ce fragment (Hornung et al. 2019). Cependant, un article récent (Hinteregger et al. 2020) montre que l'insertion du transgène codant pour le peptide $A\beta_{4-42}$ dans ce modèle impacte énormément l'expression génique et protéique du récepteur à l'acide rétinoïque β (RAR β). Cette découverte remet tous les résultats en doute, est-ce que l'effet délétère approuvé par plusieurs équipes est bien dépendant du fragment $A\beta_{4-42}$ et non de RAR β . Malgré cette controverse, l'implication de l' $A\beta_{4-x}$ dans la pathologie semble claire. Récemment, une fonction pathogénique et physiologique d' $A\beta_{4-x}$ a été décelée. En effet, l' $A\beta_{4-42}$ forme un canal ionique stable dans les bicouches lipidiques et engendrerait donc une neurotoxicité (Karkisaval et al. 2020). D'autre part, le Dr Stefaniak énonce une réactivité avec le Cu^{2+} (Stefaniak et Bal 2019). L' $A\beta_{4-x}$ se fixerait à cet ion métallique dans le cerveau et maintiendrait la neurotransmission. La formation de l' $A\beta_{4-x}$ a souvent été une énigme et plusieurs hypothèses ont été prononcées. Certains scientifiques pensent que la génération du

peptide $A\beta_{4-42}$ pourrait être en partie non enzymatique. En effet, une décomposition du peptide amyloïde en présence ou en absence d'inhibiteurs de protéases a été retrouvée. Cependant, récemment le Dr Walter a identifié une enzyme capable de cliver l' $A\beta$ en $A\beta_{4-x}$. L'ADAMTS4, une métalloprotéase soluble, est généralement une enzyme active dans le réseau trans-golgien et aurait ses principaux substrats dans la MEC. Dans les conditions *in vitro* et *in vivo*, les données démontrent le rôle de l'ADAMTS4 dans la génération du peptide $A\beta_{4-x}$ (Walter et al. 2019).

(c) Formes particulières : $A\beta$ Pyroglutamate3-x

Pour clôturer la discussion sur $A\beta$ et ses formes tronquées, je finirais avec l' $A\beta_{pE3-x}$. Ce fragment est récemment reconnu dans son implication dans la MA et serait un des facteurs précoces de la pathologie. L'identification d' $A\beta_{pE-x}$ a débuté dans les années 90 grâce aux équipes des Drs Mori et Saido (Mori et al. 1992 ; Saido et al. 1995). La création d'anticorps ayant différents épitopes sur $A\beta$ ainsi que la spectrométrie de masse ont permis à ces deux équipes de découvrir ce fragment dans les plaques séniles.

i. Enzyme impliquée dans la formation de l' $A\beta_{pE3-42}$: la glutaminyl cyclase

Ce fragment protéolytique est le résultat d'une succession de clivages enzymatiques sur la β APP avec l'intervention de la β -sécrétase et de la γ -sécrétase puis sur l' $A\beta_{42}$ grâce à la meprin β , les aminopeptidases, les dipeptidyl peptidases et à la glutaminyl cyclase (Citron et al. 1994, 1996). La glutaminyl cyclase (QC) aussi nommée QPCT/L ou EC2.3.2.5 présente deux isoformes, une dite QC sécrétrice et l'autre dite QC golgienne. Les gènes QPCT et QPCTL sont localisés sur les chromosomes 2 et 19 et les protéines produites présentent une séquence signal N-terminal les localisant dans le compartiment cellulaire adéquat (Cynis et al. 2008 ; Schilling et al. 2004, 2008). Physiologiquement, cette enzyme a pour objectif de convertir le glutamate (Glu) et la glutamine (Gln) en acide pyroglutaminyle. Cette conversion sur la région N-terminale crée une résistance à la dégradation et donc aboutit à un temps de demi-vie plus longue pour la protéine. Grâce à des souris KO pour cette enzyme, les substrats connus sont la GnRH, la TRH, le CCL2 et $A\beta$ (Fischer et Spiess 1987). Ces souris présentent une hypothyroïdie et un déficit de CCL2. Dans le cas du développement de la MA, la catalyse de l' $A\beta_{3/11-x}$ s'accroît jusqu'à atteindre plus de 25% de l' $A\beta$ dans un cerveau de patient malade

(Güntert, Döbeli, et Bohrmann 2006; Harigaya et al. 2000). La QC (Morawski et al. 2010, 2014) est surexprimée précocement dans les régions du néocortex et dans les sous-régions hippocampiques chez la souris et dans les noyaux sous-corticaux (noyau Basal Meynert, Edinger-Westphal, Locus Coeruleus) chez l'être humain (Gunn et al. 2020). La surexpression de la QC et l'apparition des formes pyroglutamates d'A β semblent corrélés dans les patients MA au niveau anatomique mais aussi au niveau des déclin cognitifs. Pour mieux comprendre l'effet de cette enzyme dans la maladie, le Dr Schilling et le Dr De Kimpe ont caractérisé la cyclisation de QC sur A β à l'aide de différentes lignées cellulaires, de modèles murins et de l'inhibiteur PBD150 (De Kimpe et al. 2012, 2013). L'ensemble de ces travaux affirme que QC est impliquée dans la progression de la pathologie en fonctionnant à un pH plutôt acide, pH6 (pour Glu) et que l'homéostasie calcique jouerait également sur l'activité QC. Une déplétion de Ca²⁺ dans le RE augmente spécifiquement l'expression génique et protéique de la glutaminyl cyclase (Hoffmann et al. 2017). Récemment, une prodrogue en phase 2, PQ912, a été créée pour agir sur la glutaminyl cyclase et montre un effet bénéfique en préclinique.

ii. Toxicité de ce fragment

Vu sa forte présence dans les patients MA, beaucoup d'équipes ont travaillé sur la caractérisation du fragment A β_{pE3-x} (Cabrera et al. 2018 ; Wittnam et al. 2012). D'un point de vue structurel et selon les propriétés biophysiques de ce fragment (Dammers et al. 2017), A β_{pE3-x} présente une rapidité d'agrégation plus importante (D'Arrigo, Tabaton, et Perico 2009) que celle des autres espèces d'A β ainsi qu'une forte hydrophobicité (perte des deux acides aminés chargés négativement). A β_{pE3-x} se replie très rapidement en feuillets β provoquant son oligomérisation et affectant l'agrégation d'A β_{1-42} . Ces propriétés biochimiques lui confèrent la formation de fibrilles et de canaux ioniques de plus large diamètre que celle d'A β_{42} (140nm vs 19nm) procurant donc une augmentation de la perméabilité ionique (Gillman et al. 2014 ; Gunn et al. 2016 ; J. Lee et al. 2014). L'ensemble de ces paramètres confirme sans aucun doute l'impact de ce fragment dans la pathologie (Nussbaum et al. 2012 ; Schlenzig et al. 2009 ; Wirths et al. 2009). En effet il a été montré par immunohistochimie ou immunoprécipitation que le fragment A β_{pE3-x} constitue le peptide majoritaire dans les plaques compactes et diffuses ainsi qu'en intra-neuronal (Harigaya et al. 2000 ; Portelius et al. 2010). Par des injections d'A β_{pE3-x} chez la souris (Youssef et al. 2008) ou par des modèles murins transgéniques spécifiques (TBA2.1), il a été démontré que l'A β_{pE3-x} induit une perte neuronale de plus de 35% à l'âge de 12 mois ainsi qu'un déclin cognitif et moteur (Alexandru et al. 2011; Meißner,

Bouter, et Bayer 2015). D'autres modèles murins tels que les souris APP/PS1KI, 3xTg-AD, 5xFAD (Jawhar et al. 2011 ; Wirths, Bethge, et al. 2010) ou même la drosophile confirment la neurotoxicité et la présence d'A β _{pE3-x} en intra-neuronal mais spécifiquement dans les lysosomes (De Kimpe et al. 2013) et dans les cellules gliales. Pour interférer avec les impacts de l'A β _{pE3-x}, plusieurs équipes ont testé les effets d'une immunothérapie ou l'application d'inhibiteurs tels que LY3002813, 9D5, 3D6, mE8 ou le D3 (Acero et al. 2020 ; DeMattos et al. 2012 ; Wirths, Erck, et al. 2010). Dans toutes les conditions malgré les différents modèles, on distingue une amélioration des performances cognitives, une diminution du niveau de l'expression d'A β _{pE3-x}, une diminution des plaques séniles et une augmentation de la microglie (Crehan et al. 2020). Très récemment, des articles énoncent une corrélation entre la présence d'A β _{pE3-x} et de pTau. Des souris KO de Tau, des cultures primaires de neurones et des patients MA révèlent que l'agrégation d'A β _{pE3-x} et sa toxicité sont dépendantes de Tau et qu'il existe une corrélation entre Tau hyperphosphorylée et ce fragment chez les patients MA (Mandler et al. 2014 ; Nussbaum et al. 2012). Du fait de l'implication importante de l'A β _{pE3-x} dans la MA et du manque de connaissance sur les enzymes capables de cliver la région N-terminale du peptide A β en amont de la glutaminyl cyclase, mon projet de thèse a donc été d'étudier deux exopeptidases potentiellement impliquées dans ce clivage.

PROJET DE THESE: Clivages enzymatiques de la région N-terminale d'A β

Actuellement, une nouvelle vision sur le développement de la pathologie est observable grâce aux récentes découvertes. Même au sein de mon laboratoire d'accueil, nous montrons qu'une multitude de catabolites de la β APP présente des effets délétères de manière précoce et exacerbe la progression de la pathologie. Avant mon arrivée, le travail du Dr Jean Sevalle en 2009 a mis en évidence une action de l'aminopeptidase A sur l'A β entier *in vitro* (développé en 3.B.2). Dans le cadre de mon projet de thèse, deux exopeptidases, APA et DPP4, ont été analysées afin d'évaluer leur contribution dans la troncation de la région N-terminale d'A β de manière plus intégrée et d'étudier les effets sur le trouble cognitif.

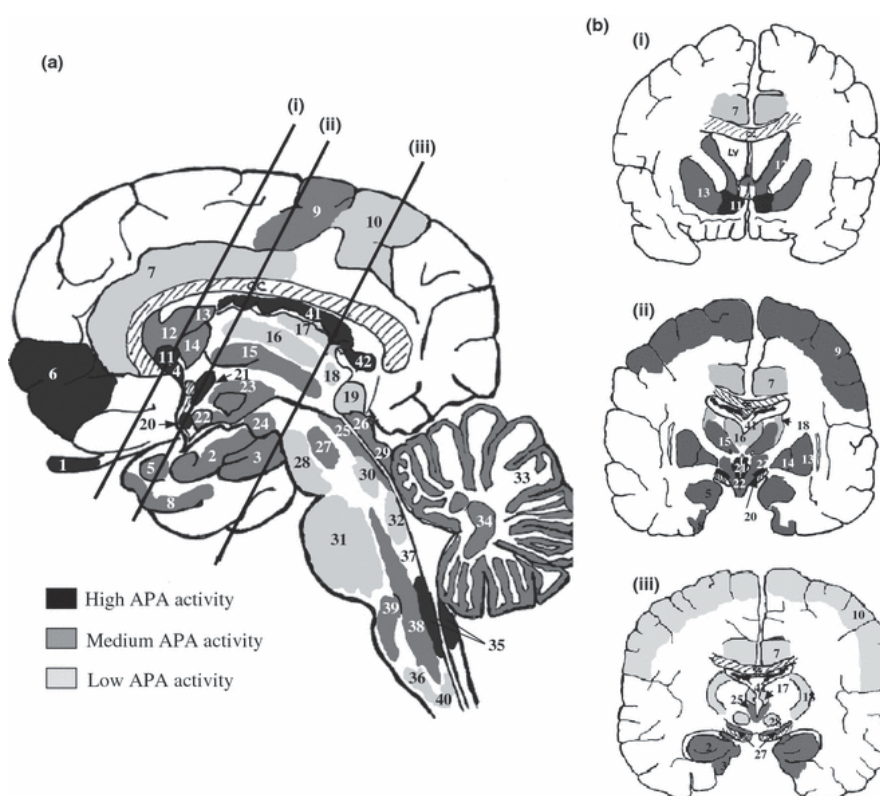


Figure 22: Cartographie de l'activité enzymatique de la protéine APA dans le cerveau. (de Mota et al. 2008) Son activité est fortement présente dans le plexus choroïde (41), la glande pinéale (42), dans la médulla dorsomédiale (35), cortex préfrontal (6), septum (4), bulbe olfactif (1), noyau accumbens (11) et les noyaux hypothalamiques (20 et 21).

A.APA

1. Structure

Les aminopeptidases font partie d'un groupe hétérogène d'enzymes appartenant à la famille des métallopeptidases M1 à zinc. La glutamyl aminopeptidase, nommée aussi APA, ENPEP, CD249, gp160 ou EC3.4.11.7, clive l'acide aspartyl d'un peptide dans sa région N-terminale. Dans la région promotrice du gène *ENPEP* (chromosome 4), on peut distinguer 6 sites de facteurs de transcription pouvant jouer sur sa production. Par exemple, le site de fixation du microRNA miR-125b sur le gène *ENPEP* agit comme suppresseur de tumeur dans la tumorigénèse mammaire (Feliciano et al. 2013). En comparant la séquence génique (Holmes, Spradling Reeves, et Cox 2017), une forte homologie existe entre les différents mammifères (71 à 98%) et une expression considérable est présente dans l'ileum de l'intestin ainsi que dans le cortex rénal (particulièrement dans les glomérules et les tubules proximaux). En améliorant les techniques employées, l'expression d'APA a été également découverte dans le cerveau. Dans la [Figure 22](#), nous pouvons constater que l'activité d'APA est non homogène dans l'encéphale et qu'elle est principalement impliquée dans le système rénine-angiotensine (RAS) de manière physiologique (de Mota et al. 2008).

Avant de débattre sur la fonction de cette enzyme, différentes équipes ont identifié l'organisation structurale et ses spécificités pour permettre entre autre de développer des inhibiteurs tels que EC33 ((S)-3-amino-4-mercapto-butyl sulfonic acid). APA est une protéine transmembranaire de 160 kDa, composée d'un domaine extracellulaire de 107 kDa en hélices α (8, 9, 14) permettant la catalyse des substrats (spécifiquement les acides aminés Asp213, Asp218 et Glu 215) et d'une région garantissant la spécificité du substrat et de l'inhibiteur (rôle de l'acide aminé Thr348). Le domaine C-terminal, quant à lui est requis pour la dimérisation de l'enzyme et le maintien fonctionnel d'APA par un bon repliement protéique et une bonne localisation cellulaire. Lors de la maturation protéique d'APA, quinze sites de N-glycosylations sont répertoriés chez l'humain et auraient sans doute un rôle dans sa localisation et dans sa fonction. Cependant aucun article n'identifie le rôle de ces glycosylations. Une des particularités enzymatiques d'APA est son accommodation à réguler divers substrats en fonction de la présence ou de l'absence de Ca^{2+} (Y. Yang et al. 2013). En absence de Ca^{2+} , APA favorise sa fixation avec des substrats ayant une arginine (Arg) en première position dans la

région N-terminale. A l'inverse en présence de Ca^{2+} (Couvineau et al. 2017), l'enzyme se lie préférentiellement avec des substrats commençant par Glu ou Asp (Arendse et al. 2019). L'ensemble de ces recherches a donné lieu à la détermination de l'implication fonctionnelle de cette enzyme. Dans le cadre de mon travail, j'ai employé une prodrogue nommée RB150 ou firibasta (Figure 23) qui, après coupure par une réductase cérébrale, inhibe l'activité enzymatique d'APA. Cet inhibiteur donné, par collaboration, par le Pr Bernard Roques a largement été utilisé pour des études travaillant sur l'hypertension cérébrale, une pathologie révélant le rôle physiologique d'APA et m'a permis d'étudier l'implication d'APA sur la maladie d'Alzheimer.

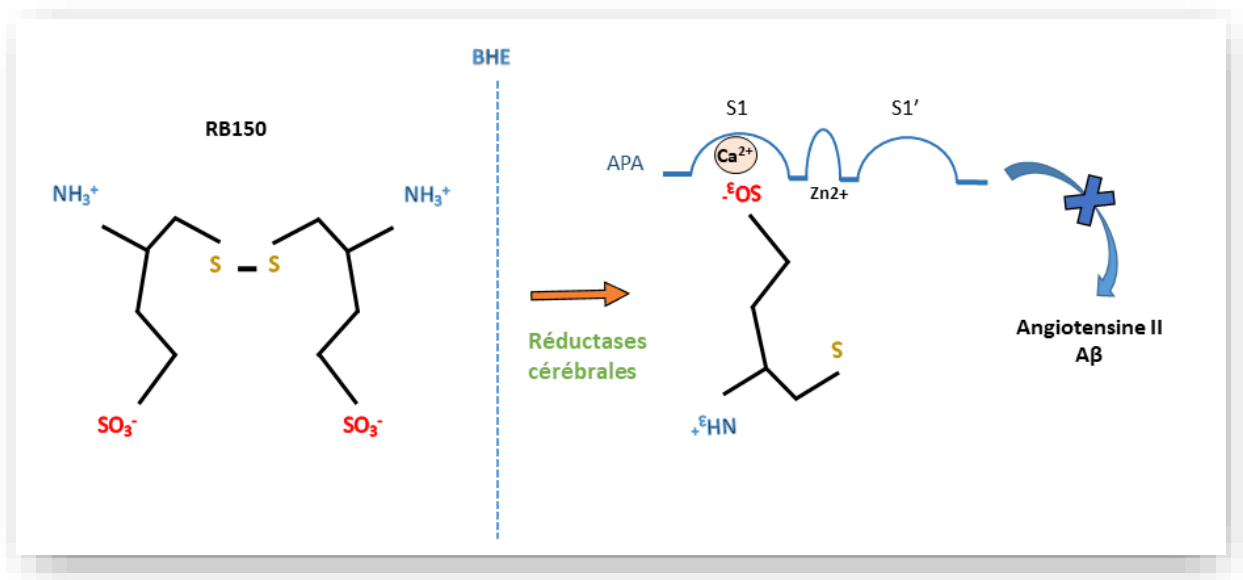


Figure 23: Inhibiteur pharmacologique spécifique d'APA. Le RB150 est une prodrogue pouvant être injectée en i.c.v ou ip et permettant d'inhiber l'enzyme APA spécifiquement dans le cerveau. Cet inhibiteur se loge dans la région S1, partie spécifique de la fixation des divers substrats. Grâce au travail de l'équipe du Dr Llorens-Cortes, la vérification de la biodisponibilité a été effectuée, me permettant d'avoir un repère sur les techniques à employer. Ils ont aussi observé l'effet d'APA sur l'hypertension cérébrale.

2. Fonctions physiologiques et pathologiques

APA est impliquée physiologiquement dans la régulation de la pression sanguine (Tsujimoto et al. 2008) et de la formation des vaisseaux dans de nombreux organes (cerveau, cœur, rein...). Des KO *ENPEP* montrent des défauts d'angiogenèse via une baisse de sécrétion de facteur de croissance et de formation des vaisseaux. En effet, l'enzyme APA a divers rôles importants pour la néphrogénèse (Dijkman et al. 2006) et l'équilibre métabolique via son implication dans le système rénine-angiotensine-aldostérone (RAAS). L'Angiotensine II, générée par ACE, est par la suite clivée par APA pour former l'Angiotensine III (Figure 24). Ces substrats ont des affinités différentes avec les récepteurs AT₁R et AT₂R aboutissant à des régulations sur la pression sanguine, la fonction rénale avec la réabsorption du NaCl, la prolifération cellulaire et la cognition (Savaskan et al. 2001). Pour confirmer l'implication d'APA dans chacune de ces voies, plusieurs équipes ont étudié son impact dans de multiples pathologies.

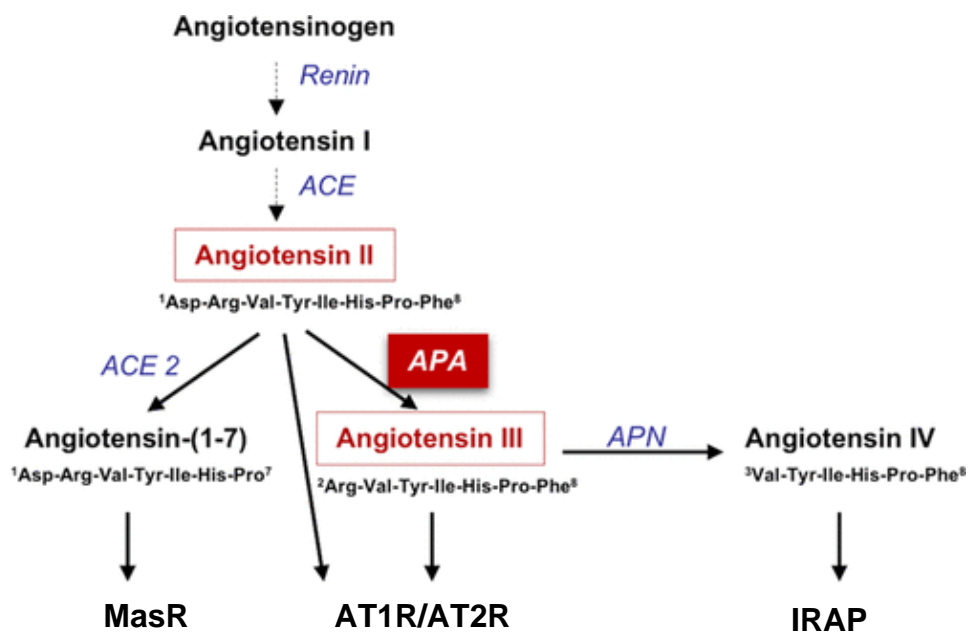


Figure 24: Fonction de l'aminopeptidase A dans le système rénine-angiotensine (Llorens-Cortes et Touyz 2020). Enchaînement de clivages enzymatiques de l'angiotensinogène (produit dans le foie) aboutissant à la formation de l'angiotensine (1-7), l'angiotensine III et l'angiotensine IV. Ces substrats procurent entre autre un équilibre de vasodilatation et vasoconstriction des vaisseaux sanguins. (IRAP : insulín –regulated aminopeptidase ; ACE : Ang-converting enzyme ; ATR : Ang-receptor; MasR: Mas receptor)

Dans la plus grande partie des cas, les études travaillant sur APA se tournent sur l'oncologie et l'hypertension (Carey 2013). Une dérégulation de l'activité d'APA est impliquée dans l'initiation de la tumorigénèse du rein (Blanco et al. 2014), du col de l'utérus (Suganuma et al. 2004), du côlon et des seins. Dès 1993, le Dr Nanus (Nanus et al. 1993) montre une corrélation entre l'expression de la gp160 (c'est-à-dire APA) et la résistance de l'effet antiprolifératif impliqué par α -IFN dans les carcinomes rénaux (RCC= renal cell carcinoma). Par la suite des études plus récentes confirment ce déséquilibre d'activité enzymatique dans du tissu rénal ou colorectal (Chuang et al. 2017), avec une augmentation de l'activité d'APA soluble dépendante du volume tumoral. A l'inverse un déficit d'APA révèle une baisse du volume et de la migration tumorale avec une relation étroite entre l'expression d'APA, de TWIST et de NF- κ B.

Le développement et le maintien de l'hypertension impliquent également la protéine APA (Nakamura et al. 2017 ; Reaux et al. 1999). Divers modèles de rongeurs ayant la surexpression de la rénine ou de l'angiotensinogène humaine, présentent de l'hypertension. L'équipe du Pr Bernard Roques a développé un inhibiteur d'APA (EC33) et l'équipe du Dr Llorens-Cortes démontre dans un premier temps que l'Angiotensine III (Ang III) est le principal facteur du RAS cérébral (Marc et al. 2012; Speth et Karamyan 2008) contrôlant la pression sanguine et la libération de l'arginine vasopressine (AVP). Au vue du contrôle de la stimulation tonique de l'Angiotensine III, le développement d'une pro-drogue passant la BHE a été généré pour APA (le RB150). En 2008 et 2018, deux articles (David et al. 1999 ; J. Gao et al. 2014) observent un effet prometteur du RB150 (par une prise orale aigüe ou chronique) avec un effet dose sur la pression sanguine de rat DOCA-Salt (Llorens-Cortes et Touyz 2020). Grâce à ces résultats, nous avons donc défini nos conditions d'utilisation et nous avons administré cette prodrogue par ip à 15mg/kg dans le modèle 3xTg-AD (développé dans la partie 4). Récemment, APA a été considérée comme étant un facteur de risques de développer des fibrillations auriculaires. Une étude sur le gène *PITX2*, impliqué dans le développement cardiaque et l'asymétrie des ventricules droit et gauche, stipule que des éléments cis régulateurs agissent sur le gène *PITX2* mais aussi sur le gène *ENPEP* (Aguirre et al. 2015).

Pour terminer sur les fonctions de cette enzyme, plusieurs équipes révèlent une action d'APA sur le peptide A β et témoignent d'une dérégulation du système RAAS chez les patients (Gard et al. 2017; Savaskan et al. 2001; Sevalle et al. 2009). En effet le peptide A β présente dans sa région N-terminale l'acide aspartyl, substrat affiné de l'aminopeptidase A. Mon équipe d'accueil révèle que des traitements avec l'EC33 dans des cellules HEK APP_{mut.} suédoise

augmentent significativement la présence d'A β commençant par l'aspartyl. Grâce à des extraits membranaires, l'action d'APA sur la recombinante C100 n'est présente qu'avec l'ajout de Ca²⁺. Ce résultat renforce l'hypothèse du clivage de l'A β entier en forme tronquée dans la région N-terminale (Sevalle et al. 2009). Indirectement d'autres travaux supportent de près ou de loin un effet d'APA dans la pathologie. L'équipe du Dr Savaskan observe que plusieurs composants du RAAS sont en augmentation chez les patients MA. Une inhibition d'ACE favoriserait l'apprentissage et la mémoire en diminuant l'angiotensine II jouant en partie sur la libération d'acétylcholine mais donnerait aussi moins de substrat pour APA (Mizutani et al. 2008). Récemment en 2017, l'équipe du Dr Kehoe confirme cette dérégulation du RAAS chez les patients MA. Il montre une corrélation entre l'augmentation de l'Angiotensine III (produit d'APA) et la charge en A β insoluble et Tau parenchymateux (Kehoe et al. 2017). L'expression de l'enzyme APA semble être réduite mais son activité a une tendance à l'augmentation. A contrario un autre article montre une diminution de plusieurs aminopeptidases dont APA, dans le plasma de patients MA (Puertas et al. 2013). L'ensemble de ces découvertes suggère une implication de l'enzyme APA sur la pathologie à la fois dans le système RAAS et dans la formation d'A β n-tronqués (Wright et Harding 2019).

B.DPP4

1. Structure

Dans le cadre de mon projet, j'ai étudié la dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) comme deuxième enzyme candidate à la troncation du peptide A β . Cette enzyme, connue aussi sous le nom de CD26 et EC3.4.14.5, est une glycoprotéine transmembranaire de 110 kDa ayant quatre domaines principaux et appartenant à la sous-famille S9B avec un motif commun à ce groupe : le Gly-X-Ser630-X-Gly (Lambeir et al. 2003). Généralement, l'expression de DPP4 se situe dans les cellules des tubules proximaux du rein, des intestins, du foie, dans les lymphocytes et dans le cerveau. DPP4 est présente également dans les fluides biologiques (Nargis et al, 2018) tels que le sang et le LCR (Abbott et al. 1994 ; Ogata et al 1989 ; Ulmer et al. 1990). La plus grande partie de cette sérine exopeptidase se situe en extracellulaire avec une région catalytique, un domaine riche en cystéine et un site de glycosylation. L'ensemble de ces régions et la maturation protéique, telle que la N-glycosylation de l'Asn 319, sont essentiels au bon fonctionnement de DPP4 (Figure 25).

2. Fonctions physiologiques et pathologiques

Aujourd'hui, plus d'une vingtaine de substrats biologiques et pharmacologiques sont répertoriés et interagissent avec DPP4 (Nistala et Savin 2017). Cette enzyme est présente sous différentes formes (ancrée à la membrane ou soluble) et n'est active que lors de son homodimérisation. Son interaction avec ses différents partenaires lui confère une multitude d'activités enzymatiques ou non enzymatiques (Matteucci et Giampietro 2009; Ohnuma 2008). Tout d'abord, par le biais de sa région riche en cystéines, DPP4 interagit avec la Adénosine Déaminase (ADA), la FAP α , les glycoprotéines du HIV, la Cavéoline-1 et la MEC, particulièrement le collagène et la fibronectine (Glorie, D'Haese, et Verhulst 2016). Ces interactions sont impliquées dans le remodelage et l'invasion cellulaire en dégradant la MEC et dans l'inflammation en régulant la prolifération (D. M. T. Yu et al. 2006) et la migration des lymphocytes T (Casrouge et al. 2018). De nombreuses pathologies, que j'énumérerai dans le paragraphe suivant, stipulent une dérégulation de ces mécanismes aboutissant à des maladies inflammatoires ou des cancers. En parallèle, son activité protéolytique permet le clivage de

substrats présentant un dipeptide x-proline, x-alanine ou x-glycine dans sa région N-terminale. DPP4 hydrolyse de nombreux substrats jouant particulièrement sur l'homéostasie glycémique et inflammatoire. En effet DPP4 module les incrétines (GLP-1/GIP), le glucagon, les chemokines, SDF-1, NPY, PYY, SP, BNP, PACAP... (Figure 25)

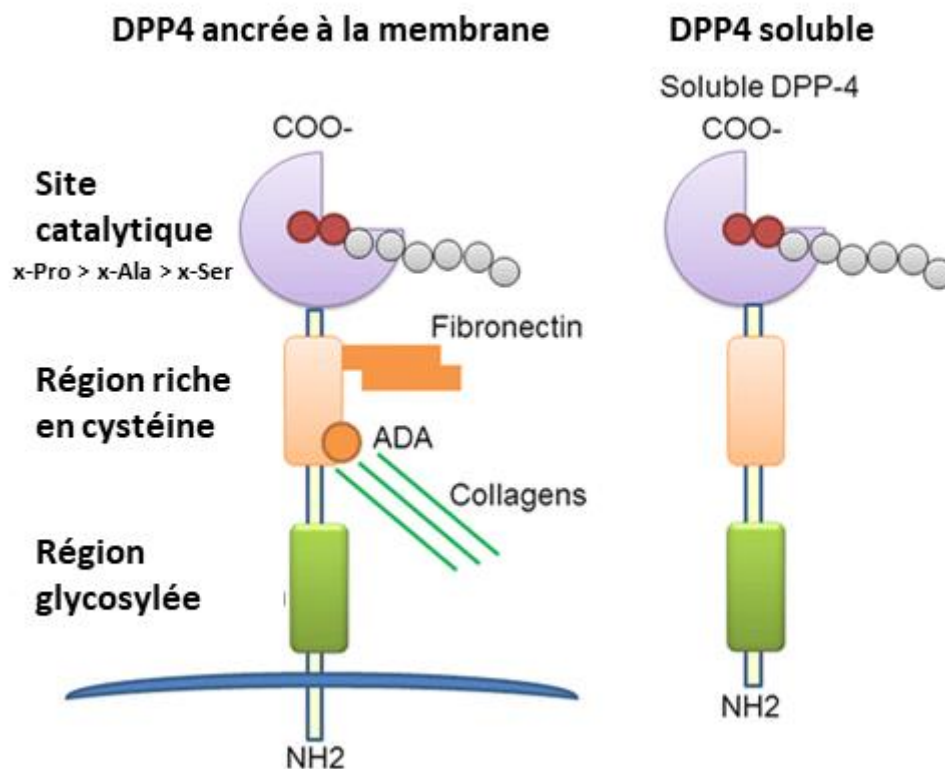


Figure 25 : Caractéristiques structurales de la Dipeptidyl-peptidase 4 (*S. Shi, Koya, et Kanasaki 2016*). DPP4 est une sérine exopeptidase présente sur le chromosome 2q23 contenant 766 acides aminés. Cette enzyme comprend une longue partie C-terminale et un court domaine N-terminal. Son monomère comprend de nombreuses hélices α , un domaine α/β hydrolase avec les trois acides aminés nécessaires pour la catalyse (Asp708, His 740 et Ser 630) et des feuilletts β dans la partie N-terminale, zone de glycosylation et de stabilisation des dimérisations. La principale partie permettant l'interaction avec les substrats est la poche S1 qui s'accommode parfaitement avec les résidus Pro ou Ala. Les autres sites S2 ou S1' reconnaissent plutôt les larges chaînes aromatiques ou aliphatiques.

De nombreuses équipes témoignent du rôle considérable de cette enzyme dans un grand nombre de pathologies telles que le cancer (Beckenkamp et al. 2016), le diabète de type 2 et la MA. Dans le cas des cancers (Figure 26), l'expression et l'activité de DPP4 semblent dépendre du microenvironnement et de l'organe. La progression tumorale est liée aux interactions de DPP4 avec les protéines d'adhésion ou de la MEC (Arscott et al. 2009; Mares 2012). Dans le cas d'un gliome, DPP4 est considérée comme suppresseur de tumeur (Enz et al. 2019, 26). Plusieurs travaux du Dr Busek montrent une diminution du développement tumoral lors de la surexpression de DPP4 dans deux lignées cellulaires (P. Busek et al. 2008; Petr Busek et al. 2012). Son action bénéfique dépendrait de son activité enzymatique sur les SP et SDF-1 α affectant la prolifération et l'invasion cellulaire (Zhong et Rajagopalan 2015).

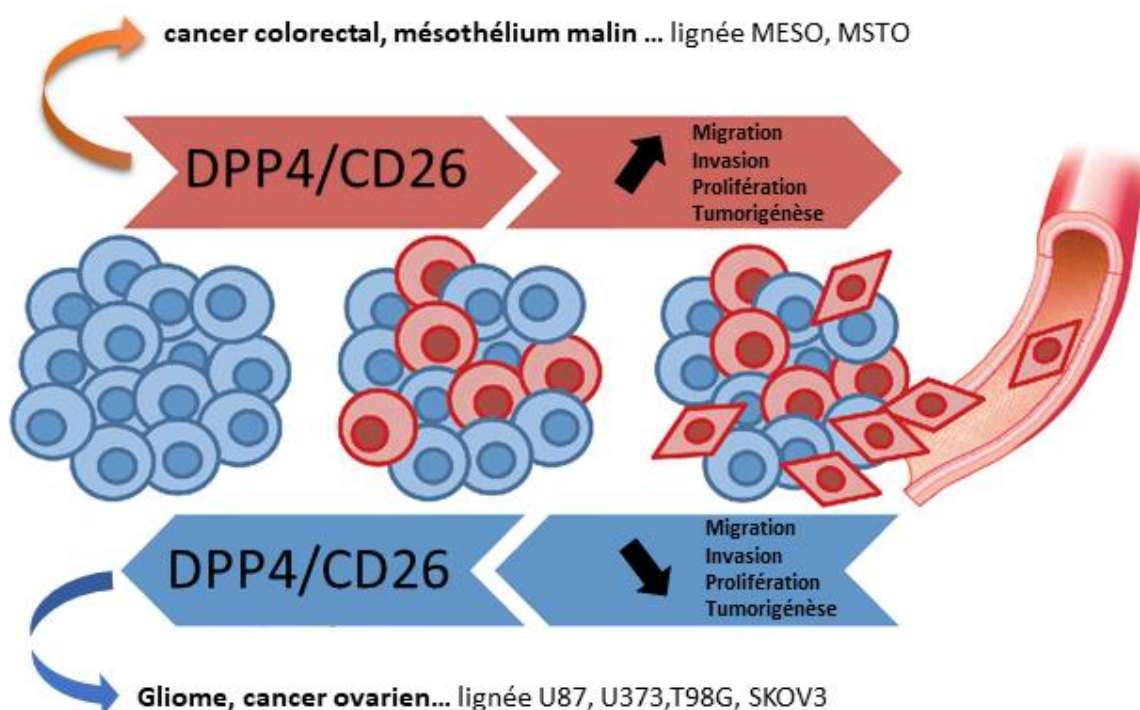


Figure 26 : Rôles de DPP4 dans les cancers (Beckenkamp et al. 2016). Selon les organes touchés par un cancer, l'ensemble des chercheurs découvre que DPP4 promeut la tumorigénèse représentant un marqueur malin comme dans le cas de tumeurs colorectales (H. J. Choi et al. 2015) ou à l'inverse serait bénéfique pour inhiber la progression de la pathologie dans le cas de gliomes.

La déficience de DPP4 dans la souris ou le rat démontre la forte implication de cette enzyme dans l'homéostasie glycémique (Ahrén et al. 2007). Le Dr Marguet découvre une

meilleure tolérance au glucose (Flatt, Bailey, et Green 2008), une augmentation de la sécrétion de l'insuline et une baisse de la présence du glucose dans le sang des souris KO DPP4 (Marguet et al. 2000). En effet, GLP-1 et GIP sont des régulateurs majeurs de la sécrétion d'insuline post-prandiale et sont en grande partie sous le contrôle de DPP4 (Röhrborn 2015). Après un an de traitement à la sitagliptine (Aston-Mourney et al. 2013) ou avec des traitements plus courts, des équipes confirment l'effet bénéfique d'une inhibition de DPP4 avec la baisse du glucose dans le sang, l'augmentation de la réponse GLP-1/insuline et la diminution de la perte des cellules β pancréatiques (Satoh-Asahara et al. 2013 ; Turdu et al. 2018).

Pour finir sur les fonctions de DPP4, la découverte d'un effet neuro-protecteur et cognitif après un traitement ciblant cette enzyme, a permis de pointer un rôle potentiel de DPP4 dans la MA (Hibar et al. 2017 ; Isik et al. 2017). En effet, plusieurs thérapies (Boccardi, Murasecco, et Mecocci 2019; Jost et al. 2009 ; Kawasaki et al. 2018 ; Kosaraju et al. 2013, 2014, 2017) révèlent une amélioration de la cognition en impactant le fonctionnement mitochondrial, la neuro-inflammation, le dépôt d'A β et la phosphorylation de Tau. Après la détection de DPP4 dans le cerveau (H.-G. Bernstein et al. 1987, 2018), la plupart des équipes ont observé une augmentation de son expression au cours du vieillissement et dans le LCR de patients MA (Aoyagi et al. 1993 ; K. M. Kim et al. 2017). Les Drs Antonyan, Sharyoan et D'Amico démontrent que DPP4 est capable d'agir directement sur A β (Antonyan et al. 2018 ; D'Amico et al. 2010 ; Sharoyan et al. 2013). En parallèle, d'autres articles témoignent que les aires touchant la cognition présentent une baisse significative de glucose, sous-entendant bien entendu une action pathologique de DPP4 dans ces aires. L'ensemble des approches pharmacologiques promeuvent la biogénèse mitochondriale (Weng et al. 2019) par une augmentation de l'expression du complexe I,V, du PGC-1 α , TFAM et p-CREB, améliorent la neurogénèse grâce à l'axe SDF-1 α /CXCR4 (Chalichem, Sai Kiran, et Basavan 2018), la neurotransmission par la présence d'insuline, la réponse inflammatoire en inhibant TNF- α et IL1 β (Wiciński et al. 2018) et la pathologie Tau en inhibant la forme phosphorylée Tau pSer396.

Modèles d'études « *In vivo* » de la maladie d'Alzheimer

Pour comprendre les mécanismes moléculaires et développer des thérapies, les chercheurs ont généré divers modèles d'études « *in vivo* ». Dans la MA, toutes les espèces animales utilisées dans le domaine de la science ont été employées à la compréhension de cette pathologie. En particulier, le modèle murin dénombre plus de 180 modèles « Alzheimerisés » avec majoritairement l'insertion d'un ou plusieurs transgènes de la β APP, PSEN et Tau. Les premières générations de souris transgéniques surexprimaient des mutations sur la β APP ou étaient invalidées pour cette protéine (Bilkei-Gorzo 2014). La perte de fonction a montré l'importance de la protéine β APP dans la fonction neuronale. Les KO de la β APP indiquent un rôle à la fois durant le développement du SNC mais aussi dans le maintien de la cognition au cours du vieillissement.

Pour répondre à la problématique de mon projet de thèse, les expériences « *in vivo* » ont été exécutées dans le modèle murin 3xTg-AD (Figure 27), développé par l'équipe du Dr Laferla en 2003 (Oddo et al. 2003). Ce modèle exprime le transgène humain muté Tau_{P301L}, l'APP_{mut.suédoise} et la PSEN1_{M146V} (Sterniczuk et al. 2010). Pour créer ces souris, le Dr Oddo a inséré les transgènes β APP et Tau humains sous le contrôle du promoteur Thy1.2 dans des cellules embryonnaires murines d'une chimère mutée sur le gène PSEN1. L'avantage incontestable de ces souris est la dynamique évolutive de la pathologie, ressemblant au développement de la MA chez l'humain (Bello-Medina et al. 2019). En effet les premiers signes visibles de la MA par immunohistochimie sont l'accumulation des β CTFs et des A β s en intracellulaire dès l'âge de 3 mois (Mastrangelo et Bowers 2008). Par la suite, l'hyperphosphorylation de Tau et l'agrégation d'A β augmentent en extracellulaire et sont suivies de près par des phénotypes symptomatiques à partir de l'âge de 6 mois. D'un point de vue comportemental, les souris 3xTg-AD présentent des déficits cognitifs, de mémoire épisodique, d'apathie (Bourgeois et al. 2018) et d'anxiété (Stover et al. 2015). Survenant en amont de l'apparition des plaques, des modifications du rythme circadien (Knight et al. 2013; Sheehan et Musiek 2020) et une perte de protéines synaptiques ont été décelées. Par imagerie, on distingue aussi une altération de l'assimilation du glucose dans les aires cérébrales identiques à celles impactées chez l'être humain. Ces observations ont été confirmées par grand nombre d'équipes, caractérisant ce modèle. Au cours des 5 dernières années une quarantaine de publications par an, analyse et décèle des caractéristiques moléculaires et symptomatiques de

la MA dans le modèle 3xTg-AD (Marwarha et al. 2019). Ces chiffres révèlent les atouts considérables de ce modèle et dénotent un organisme fiable à la compréhension de la MA et au développement thérapeutique. Le seul inconvénient de ce modèle est l'absence de perte neuronale significative dans l'hippocampe et le cortex. La raison plausible de ce défaut serait la limite de l'espérance de vie des souris.

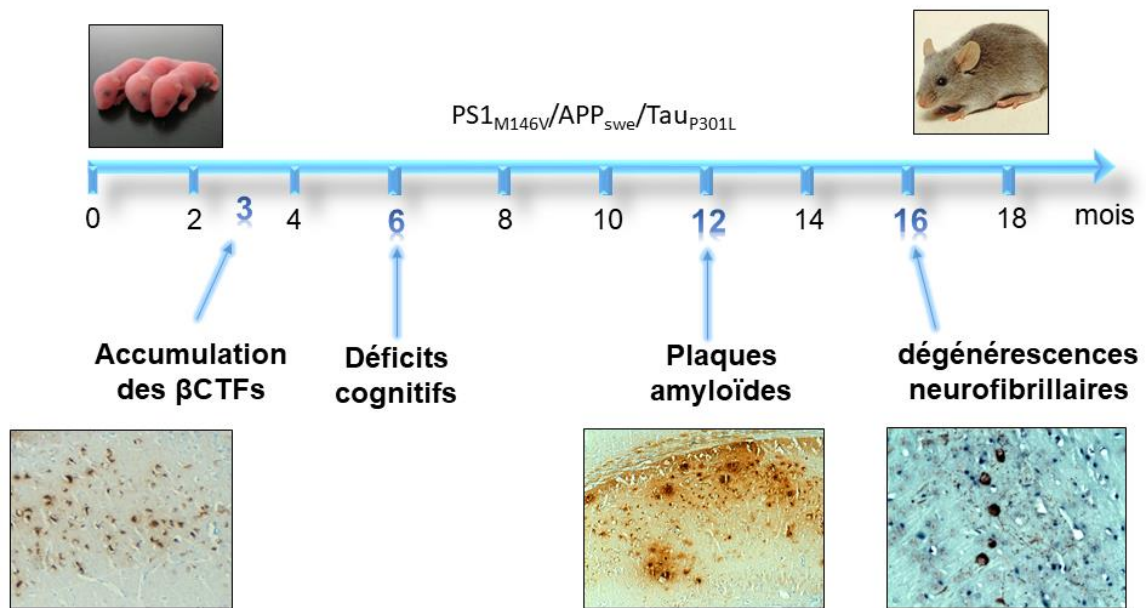


Figure 27: Chronologie des caractéristiques phénotypiques des souris 3xTg-AD.

OBJECTIFS GENERAUX

La grande variété d'espèces d'A β provenant de la protéolyse de la β APP chez les patients de la MA détaillée dans l'introduction, représente une source toxique de plus en plus avérée dans l'initiation et l'aggravation de la pathologie et évoque le besoin de développer une stratégie thérapeutique sur cet axe. En effet, l'ensemble des travaux ciblant le peptide amyloïde N-tronqué par immunisation active ou passive dénote des améliorations considérables sur les déclinés cognitifs. Dans le cas de la forme A β_{pE3-42} , le donanemab ou LY3002813 est indéniablement spécifique et semble prometteur. Seulement, les enzymes permettant la génération des divers A β tronqués en N-terminal sont toujours méconnues, à l'exception de la QC et de la meprin β .

Ainsi l'hypothèse originelle de mon directeur de thèse pour ce projet (Figure 28), sont que les enzymes APA et DPP4 clivent le peptide A $\beta_{40/42}$ entier en forme tronquée en région N-terminale et contribuent à sa toxicité. En effet, comme énoncé dans l'introduction, ces enzymes ont théoriquement des affinités avec les acides aminés présents dans la région N-terminale d'A β . Les objectifs de ce projet ont permis la préparation de deux articles scientifiques qui sont en cours de soumission dans Acta Neuropathologica et dans JBC. Ils ont permis de répondre à divers questionnements :

- 1) Est-ce que l'A β entier dans sa région N-terminale est clivé par APA et DPP4 ? Pour y répondre, nous avons testé les protéines recombinantes d'APA et de DPP4 en présence d'A β synthétique et de leurs inhibiteurs spécifiques par spectrométrie de masse. (*in vitro*)
- 2) L'Aminopeptidase A et la dipeptidyl-peptidase 4 jouent-elles sur la maturation des épines dendritiques dans des coupes organotypiques d'hippocampes ? (*ex-vivo*)
- 3) Concevoir ou utiliser des outils pharmacologiques et génétiques, invalidant partiellement ces enzymes, permettront-ils d'obtenir des impacts anatomiques et cognitifs sur le modèle murin 3xTg-AD ? (*in vivo*).

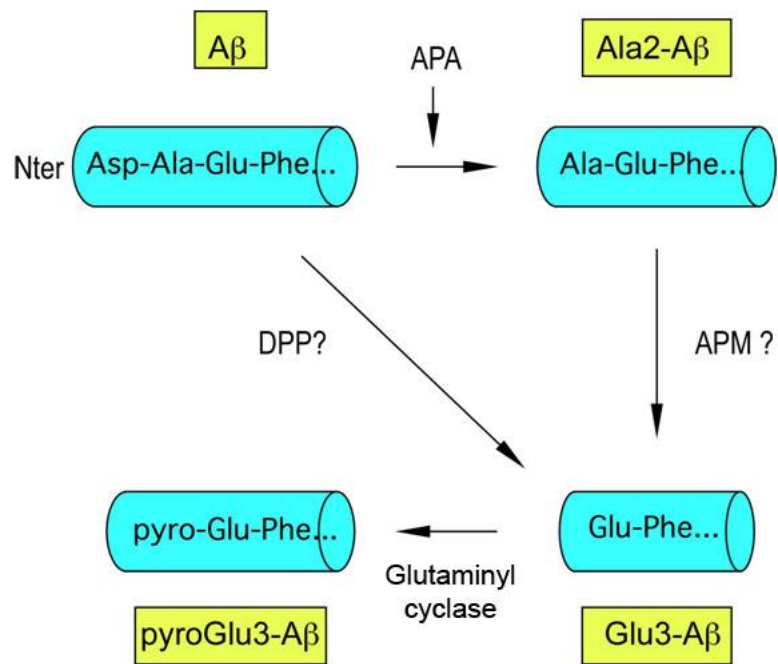


Figure 28: Hypothèse du projet. L'aminopeptidase A (APA) et la dipeptidyl peptidase 4 (DPP4) auraient des capacités de clivages permettant à la Glutaminyl Cyclase (QC) d'effectuer la cyclisation pour produire l'Aβ_{pE3-42}*

RESULTATS

A. REVUE :

« Espèces d'A β tronquées en région N- ou C-terminale : déclencheurs pathologiques clés dans la maladie d'Alzheimer ? »

N- and C-terminally Truncated A β species: key pathological triggers in Alzheimer's disease?

Cette revue énumère l'ensemble des travaux récents décrivant la biosynthèse et la neurotoxicité des peptides A β s N- ou C- tronqués dans la maladie d'Alzheimer. Elle pointe particulièrement une nouvelle hypothèse de la cascade amyloïde, plus focalisée seulement sur A β _{1-40/42} mais aussi sur l'implication complexe d'une multitude de fragments de la β APP et d'A β s. Cette revue met aussi en évidence les nouvelles stratégies thérapeutiques et biomarqueurs potentiels de la maladie d'Alzheimer.

Cette revue témoigne la présence importante d'A β s N- et C- tronqués impliqués dans la pathologie. La majorité des fragments sont localisés soit dans les plaques séniles, soit dans les vaisseaux sanguins ou soit dans le liquide céphalo-rachidien chez les patients MA. Dans le cas des A β s C-tronqués, les fragments auraient des effets plutôt protecteurs puisqu'ils seraient moins agrégeants *in vitro*, moins synapto-toxique et diminueraient la présence d'A β _{40/42}. Actuellement, les enzymes connus générant les A β s C-tronqués sont BACE, les MMPs, la néprilysine et la γ -sécrétase. A l'inverse les A β s tronqués en région N-terminale ont tous des effets toxiques dans la maladie d'Alzheimer. Les différentes équipes révèlent que l'A β ₂₋₄₂ active la réponse pro-inflammatoire en augmentant l'astro/microgliose et en diminuant IL-10, que l'A β ₄₋₄₂ altère les fonctions cognitives et compose les cores des plaques séniles et qu'A β _{pE3-42} représente une forme excessivement toxique via sa forte hydrophobicité et sa propension à l'agrégation. Dans l'ensemble des études, les caractéristiques structurales de l'A β _{pE3-42} démontrent sa forte présence dans les plaques séniles chez les patients MA, une importante perte neuronale et un déficit cognitif.

L'ensemble de ces données suggère que l'A β tronqué a un rôle central dans l'initiation et l'aggravation de la pathologie, et qu'une stratégie thérapeutique sur ces cibles serait sans doute intéressante.

Are N- and C-terminally truncated A β species key pathological triggers in Alzheimer's disease?

Published, Papers in Press, August 24, 2018, DOI 10.1074/jbc.R118.003999

Julie Dunys, Audrey Valverde, and Frédéric Checler¹

From the Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, Team labeled "Laboratory of Excellence (LABEX) Distalz," 660 Route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France

Edited by Paul E. Fraser

The histopathology of Alzheimer's disease (AD) is characterized by neuronal loss, neurofibrillary tangles, and senile plaque formation. The latter results from an exacerbated production (familial AD cases) or altered degradation (sporadic cases) of 40/42-amino acid-long β -amyloid peptides (A β peptides) that are produced by sequential cleavages of A β precursor protein (β APP) by β - and γ -secretases. The amyloid cascade hypothesis proposes a key role for the full-length A β 42 and the A β 40/42 ratio in AD etiology, in which soluble A β oligomers lead to neurotoxicity, tau hyperphosphorylation, aggregation, and, ultimately, cognitive defects. However, following this postulate, during the last decade, several clinical approaches aimed at decreasing full-length A β 42 production or neutralizing it by immunotherapy have failed to reduce or even stabilize AD-related decline. Thus, the A β peptide (A β 40/42)-centric hypothesis is probably a simplified view of a much more complex situation involving a multiplicity of APP fragments and A β catabolites. Indeed, biochemical analyses of AD brain deposits and fluids have unraveled an A β peptidome consisting of additional A β -related species. Such A β catabolites could be due to either primary enzymatic cleavages of β APP or secondary processing of A β itself by exopeptidases. Here, we review the diversity of N- and C-terminally truncated A β peptides and their biosynthesis and outline their potential function/toxicity. We also highlight their potential as new pharmaceutical targets and biomarkers.

A defining characteristic of Alzheimer's disease pathology is the presence of extraneuronal plaques composed of aggregated β -amyloid peptides (A β).² A β terminology usually refers mainly to a mix of canonical 40/42 amino acid peptides excised

This work was supported by LABEX (Excellence Laboratory, Program 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. The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

¹ To whom correspondence should be addressed. Tel.: 334-93-95-34-60; Fax: 334-93-95-7708; E-mail: checler@ipmc.cnrs.fr.

² The abbreviations used are: A β , amyloid- β ; AD, Alzheimer's disease; AICD, APP intracellular domain; APA, aminopeptidase A; APP, amyloid precursor protein; BACE1, β APP-cleaving enzyme; CA, cornu ammonis-1; CSF, cerebrospinal fluid; DPPIV, dipeptidyl peptidase 4; FAD, familial Alzheimer's disease; QC, glutaminy cyclase; LTP, long-term potentiation; MCI, mild cognitive impairment; MMP, matrix metallo-proteinase; MT5, membrane type-5; NSAID, non-steroidal anti-inflammatory drug; CTF, C-terminal fragment.

by endoproteolysis of a type I transmembrane protein called β -amyloid precursor protein (β APP) through the sequential action of two enzymes: β -site APP-cleaving enzyme (BACE1) and γ -secretase (Fig. 1A) (1). Processing of β APP by these two enzymatic activities also generates an intracellular fragment, APP intracellular domain (AICD), that behaves as a transcription factor (2, 3). Once produced, A β peptides are secreted and, upon various triggers that could be of genetic or environmental natures, accumulate and yield oligomeric aggregates. These oligomeric structures can transiently remain soluble or ultimately fibrillize and seed to form one of the main histological stigmata of AD pathology, senile plaques. However, the number of plaques is not clearly associated with disease progression and severity. Recent studies suggest that soluble, oligomeric forms of A β have an important role in neurotoxicity and memory loss (4). Thus, these oligomeric species of A β have been shown to cause synaptic dysfunction, to disrupt long-term potentiation (LTP) (5, 6), and to affect behavior in transgenic mice (7, 8).

The amyloid cascade hypothesis is strongly supported by genetic facts. Thus, all mutations responsible for early onset and aggressive forms of AD share as common denominators a modulation of total A β load, modification of A β 42 over the A β 40 ratio, or generate A β species prone to aggregation (9, 10). Thus, the amyloid cascade hypothesis is at the center of gravity of AD pathology. However, the vast majority of clinical trials centered on A β by either blocking their production or neutralizing them once produced have failed. It is thus a challenge to reconcile genetic grounds with clinical failures. It could be envisioned that the physiological function of full-length A β could have been underestimated. Furthermore, the contribution of A β -derived fragments generated by secondary cleavages or additional APP-derived fragments distinct from A β could have been underestimated. Thus, other fragments issued from β APP processing, such as the membrane-tethered fragment, C99, or β CTF, could very well contribute to pathological dysfunctions (11–13). Also, one can consider the fact that several aspects of physiological β APP processing have still to be delineated. This is exemplified by recent data showing that besides classical secretases, novel proteolytic actors recently came on stage. For example, recent works unmasked a novel cleavage site on β APP (14, 15), named Eta (η) cleavage site (14), which gives rise to a subset of new fragments (A $\eta\alpha$, A $\eta\beta$, and η CTF) (Fig. 2). The enzyme responsible for β APP cleavage at the η site has been identified as the matrix metalloproteinase MT5–MMP (15, 16).

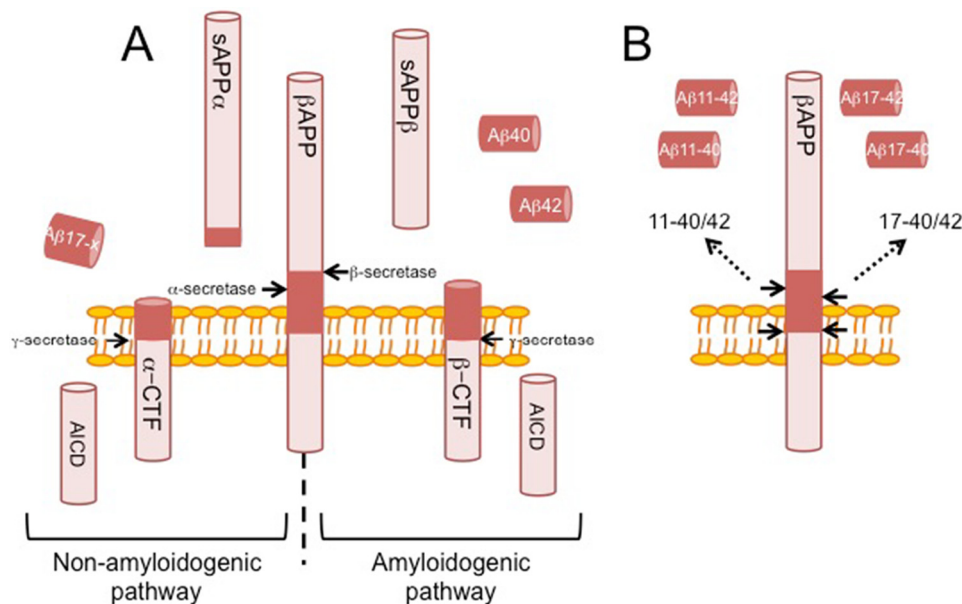


Figure 1. Processing pathways of β APP. A, amyloidogenic pathway involves a first cleavage of β APP by β -secretase generating a soluble fragment, sAPP β , and a membrane-anchored fragment, β -CTF. Secondary cleavage of β -CTF by γ -secretase releases an intracellular fragment, AICD, and full-length A β (A β 40 and A β 42). A nonamyloidogenic pathway involves a first cleavage by α -secretase releasing a soluble fragment, sAPP α , and a membrane-anchored fragment, α -CTF. The latter is then processed by γ -secretase to produce an intracellular domain, AICD, and a shorter peptide, A β (17-X). B, processing of β APP at β' or α cleavage sites combined with γ -secretase-mediated hydrolysis gives rise to A β (11-X) and A β (17-X) forms of A β .

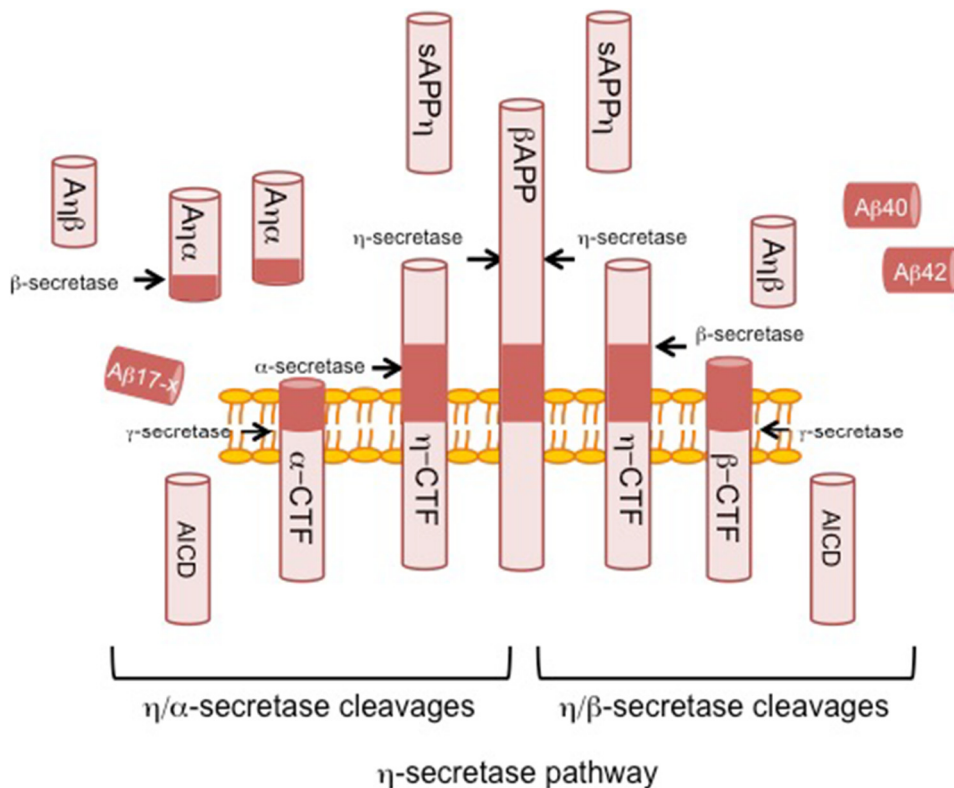


Figure 2. β APP processing by η -secretase. Full-length β APP can be processed by an alternative pathway involving a first cleavage by η -secretase (MT5-MMP) releasing a soluble fragment sAPP η and a membrane-anchored fragment η -CTF. η -CTF is then cleaved either by α -secretase or by β -secretase, producing soluble fragments named A $\eta\alpha$ and A $\eta\beta$, respectively. A $\eta\alpha$ can undergo subsequent cleavage by β -secretase. Membrane-anchored CTFs (α -CTF and β -CTF) are processed by γ -secretase activity to give rise to AICD, full-length A β peptides, and A β (17-X) peptide.

In this Minireview, we will focus on the N- and C-terminally truncated β -amyloid peptides that are produced either by primary cleavages taking place on β APP or yielded by secondary cleavages occurring on A β full-length A β 40 or A β 42. We will

describe here several N- and C-terminally truncated A β peptides, their production, biophysical properties in term of aggregation, neuronal toxicity, as well as their putative impact on Alzheimer's disease progression. We will also describe the

potential of N- and C-terminally truncated A β peptides as biomarkers as well as pharmaceutical targets.

Truncated fragments resulting from primary cleavages on β APP

Aside the well-known conventional full-length A β 40 and A β 42 peptides, several shorter A β peptides have been identified. Some of them are directly generated by primary cleavages taking place on β APP. Thus, BACE1-mediated cleavage of β APP at the β' site (17, 18) combined with γ -secretase cleavage yields A β (11–40/42), whereas α/γ -secretase cleavages generate A β (17–40/42) peptides (Fig. 1B).

It is interesting to note that FAD-linked mutations occurring on β APP or on the γ -secretase-associated proteins presenilin-1 and presenilin-2 (19) usually result in either an increase in total A β load or, alternatively, a selective increase in A β 42 and thereby A β 42/A β 40, and consistently lead to early-onset AD (20). Interestingly, Ancolio *et al.* (21) showed that cells overexpressing a β APP bearing the V715M mutation indeed behave differently because they secrete less A β 40, whereas levels of A β 42 remained unchanged. More strikingly, they described a 7-fold increase in the recovery of A β (11/17–42) with no change in A β (11/17–40) (21). These data suggest the potential toxic effect of 11/17-X fragments in AD pathology. This conclusion is supported by both anatomical, biophysical, and clinical grounds. Thus, these shorter fragments have been described in senile plaques as well as in AD and Down syndrome brains. These fragments are increased by FAD mutations on PS1 as well (22). Finally, both cleavage fragments could indicate a pathophysiological condition because expressions of the enzymes responsible for their production are regulated during AD. Moreover, A β (11-X) and A β (17-X), have been both detected in cerebrospinal fluids in patients suffering from mild cognitive impairment (MCI), *i.e.* at very early stages of the disease (23). Although levels of A β (11-X) in CSF of MCI patients seem to be lowered, A β (17-X) tends to be expressed at higher levels than in controls. Moreover, A β 40 appeared to be higher in the cerebrospinal fluid of patients with Alzheimer's disease than in patients suffering from other dementias (24).

de Strooper and co-workers (25) documented the fact that slight alterations of the A β 40/42 ratio could lead to drastic modifications in toxic potential. Ancolio *et al.* (21) support this view and further indicate that the ratio of A β -truncated fragments could also account for early onset cases of AD even when the total A β load is reduced.

Truncated fragments resulting from secondary cleavages on A β peptides

Truncated A β species could just represent by-products of A β degradation. However, these could also harbor their own spectrum of physiological and/or (according to their concentration) toxic functions. In the latter case, they could be seen as biotransformation derivatives of A β . Thus, this questions the potential weight of truncated A β species in AD pathology. As a corollary, they could represent a new set of early diagnostic markers, and thus, enzymatic activities implicated in their formation could be seen as potential therapeutic targets.

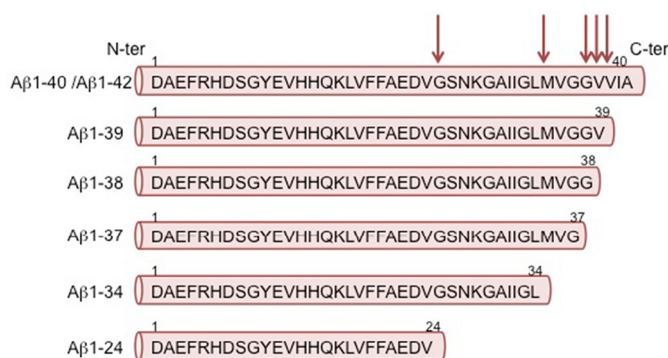


Figure 3. C-terminally truncated A β peptides. Figure shows a representation of all the C-terminally truncated A β variants. Arrows represent sites of cleavages.

C-terminally truncated A β species

A β 38, A β 37, and A β 39

Although a plethora of articles have addressed the biology of A β 40 and A β 42, the C-terminally truncated A β peptides (Fig. 3) have received much less consideration. However, in addition to A β 40 and A β 42, several A β shorter species truncated in their C-terminal moiety, among them A β 37, A β 38, and A β 39, have been identified in blood plasma samples and human cerebrospinal fluids of patients suffering from AD (26). A β 38 was even found to be the second prominent A β form after A β 40 in quantity. These peptides may be produced according to different pathways. The stepwise release of the GVV and VIA tripeptides generates A β 37 and A β 39 from A β 40 and A β 42, respectively. Moreover, A β 37 can be produced by another pathway after release of the GVVIA peptide from the A β 42 sequence (27). Production of A β 38 is influenced by nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). Although NSAID treatments tend to globally decrease A β 42 production, these compounds induce a slight shift of β APP cleavage leading to an increase of A β 38 formation (28), and this appears to occur independently of their primary target, Cox2. A β 38 production has been shown to be increased by a subset of γ -secretase modulators (29).

Immunohistological studies of A β 37 and A β 39 C-terminally truncated peptides in AD brains and transgenic mouse models have revealed that both peptides were found to accumulate in meningeal and parenchymal vessels in the brains of familial AD cases as well as in sporadic AD (30). The pattern of deposition differs between AD brains and transgenic mouse models. In sporadic or familial AD brains, the C-terminally truncated peptides appeared to be aggregated in plaques, but in transgenic mouse models, the presence of truncated peptides in plaques was more variable.

Interestingly, expression of shorter species of A β , from A β 37 to A β 40, does not elicit toxicity in *Drosophila* and even appeared to attenuate A β 42 toxicity (31). Such results suggest that treatments regulating β APP processing by favoring an increase in A β 37, A β 38, or A β 39 production could be somehow beneficial and seen as an A β 42-related inactivating pathway.

C-terminally truncated A β 34 variant

It has been demonstrated that A β 34 derived from hydrolysis of A β by BACE1 (32, 33). A β 34 is increased in cells overex-

pressing both human β APP and human BACE1, and it is interesting to note that a γ -secretase inhibitor treatment impairs A β 34 levels suggesting that A β 34 production results from a secondary cleavage that occurs after A β release by γ -secretase (34).

BACE1 inhibition decreases A β 34 in CSF (35). However, *in vitro* experiments have also pointed out that A β 34 could be produced by a secondary cleavage step on A β 40 due to matrix metalloproteases (MMP2 and MMP9) (36). These MMPs could also degrade A β 34 into shorter species (A β 30 and A β 16).

A β 34 physiology and the impact on AD progression have not been deeply assessed. This may be due to a lack of tools to directly monitor the peptide and assess its pathophysiological influence. Caillava *et al.* (37) characterized and developed an A β X-34–directed specific polyclonal antibody recognizing the C-terminal part of A β X-34. They demonstrated that A β X-34 peptides are present in 3 \times TgAD mice brains as well as in AD patient's brains. More recently, it has been shown by immunofluorescence and immunohistological studies in three different mouse models that A β 34-like immunoreactivity appears as a punctate diffuse pattern and does not label the center of senile plaques (38). Moreover, a similar histological pattern was found in the brains of AD patients, and several studies have shown that A β 34 is an abundant species in CSF of AD patients (26, 38, 39). Thus, BACE1 contributes to A β production but is also involved in its secondary cleavage as well. Whether a disruption in the balance governing and the equilibrium between A β and A β 34 underlies part of AD pathology or whether BACE1 could be seen as a beneficial enzyme contributing to A β catabolism remains to be established. At first sight, the age-related increase in BACE1 activity and the associated elevation of A β 34 argue in favor of the first hypothesis. However, Caillava *et al.* (37) showed that A β 34 could display a protective phenotype in HEK293 cells. It is possible that the A β 34-associated protective phenotype could be abolished when its aggregation occurs as has been documented for A β (40). In this context, it is noteworthy that, as is the case for A β (2, 41), A β 34 undergoes degradation by neprilysin, a peptidase, the activity and expression of which are reduced during aging. Thus, both age-related augmentation of BACE1 (42) and reduction of neprilysin expressions and activities could very well account for augmentation of A β 34 levels, aggregation, and pathogenic phenotype.

A β 24

C-terminally truncated A β 24 (A β (1–24)) is a peptide produced upon secondary cleavage of full-length A β after activation of glial cells. Such a peptide has not yet been described in the brains of AD patients. However, it has been shown that intracranial injection of synthetic A β 24 in WT mice impairs full-length A β 42 clearance through the blood–brain barrier and promotes A β 42 aggregation via its seeding properties. Moreover, the synthetic A β 24 peptide tends to promote A β 42 aggregation, whereas the A β 24 peptide itself presents a low-aggregation propensity (43). The exact nature of the enzyme responsible for A β 24 production still remains unknown. However, it is interesting to notice that a cleavage between a valine and a glycine, as is the case for A β 24 generation, is not a usual

signature of endopeptidases or exopeptidases. Noteworthy, some matrix metalloproteinases (MMP-9 or MMP-2), which are regulated by microglial activation, appeared to be involved in A β degradation, generating C-terminally truncated fragments such as A β 23, A β 30, or A β 34 (36). Their involvement in A β 24 production still awaits firm demonstration.

N-terminally truncated A β species

A β 2–X

The amino-truncated β -amyloid peptide A β (2–42) has been detected in a detergent-soluble fraction of AD brains (44) as well as in the CSF of sporadic and familial AD patients. Does this A β peptide have a physiological or a pathological function or is it only an intermediate form for another cleavage giving rise to a shorter peptide? Even if A β (2–42) has been described in CSF and brains of AD patients, very little is known about this A β species and its biological properties. However, an important aspect concerned the fact that, unlike the case for canonical A β species (45), A β (2–42) production remains poorly affected by presenilin-1 deficiency in neurons (44), although γ -secretase cleavage is obviously necessary for releasing this fragment. This could be explained by a selective involvement of presenilin-2 in A β 42 formation. This would imply that PS1 and PS2 occur in distinct cellular compartments, one of which is permissive for A β (2–42) generation. Indeed, recent works show that PS1 and PS2 occur in distinct cellular compartments (46, 47). Alternatively, one cannot rule out the possibility that a PS1-independent activity(ies) (48–52) could account for at least part of A β (2–42) production.

A β 3–X and pE3-XA β

Another pyroglutamate-modified A β that begins with the glutamate in position 3 of A β (pE3-XA β) has been described. Several lines of anatomical clues suggest a potential key role of this A β species in AD pathology. Thus, pE3-XA β has been shown to be present in quantities similar to full-length A β in senile plaques (53) but also in diffuse plaques (54) and in the vascular wall (55). Noticeably, pE3-XA β is also present in Down's syndrome-affected brains (56). pE3-42A β appeared to be a dominant isoform in the hippocampus and cortex in patients with AD (57).

pE3-XA β fragments can trigger hippocampal neuronal loss, microglial activation, and astrogliosis and impair long-term potentiation in transgenic animals expressing human pE3-XA β (58). This toxicity appears to be accounted for by the ability of pE3-XA β to seed A β and promote its deposition (59).

pE3-XA β peptide formation is a two-step process involving an N-terminal truncation releasing the first two A β residues Asp–Ala followed by an enzymatic cyclization of the glutamyl in position 3 (Fig. 4). Studies aimed at deciphering the enzymes responsible for A β 3–X formation and pyroglutamate conversion have highlighted several candidates. Sevalle *et al.* (60) delineated the contribution of aminopeptidase A (APA) to the truncation of full-length A β leading to the 3–X species. Thus, by means of two distinct selective inhibitors, APA overexpression and APA-expressing membranes, it was demonstrated that the initial step consisting of the release of the aspartyl 1 residue was elicited by APA. This was consistent with the APA's affinity for

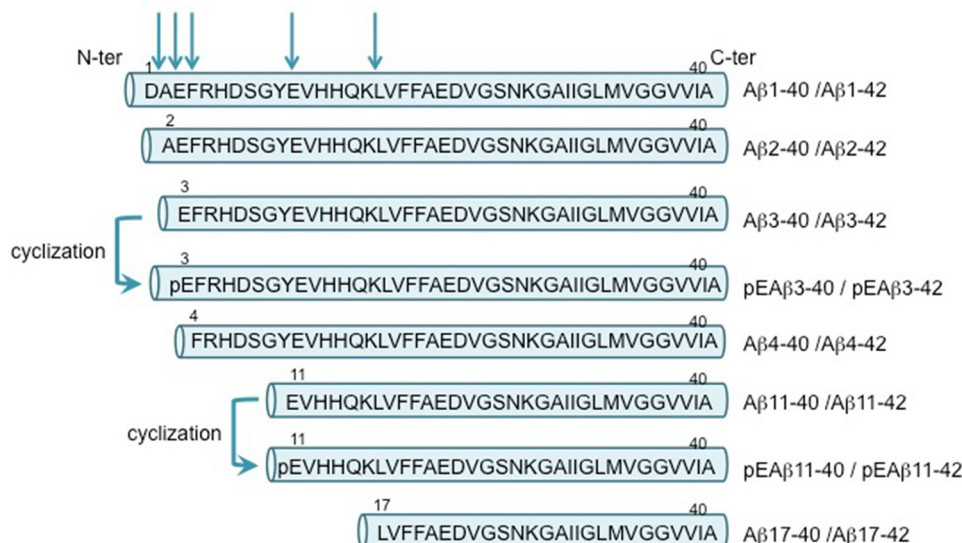


Figure 4. N-terminally truncated A β peptides. Figure shows a representation of all the N-terminally truncated A β variants. Arrows represent sites of cleavages.

acidic residues (61). APA seems not to be the only exopeptidase responsible for N-terminal truncations of A β and exposition of glutamate at position 3. Implication of a member of the dipeptidyl peptidase family enzymes (DPP) has been previously suggested (62). Recently, *in vitro* experiments using MALDI-TOF MS applications have pointed out the possible implication of DPPIV in A β 3-X formation (63). Interestingly, A β 40 peptide appeared to be the more prone to DPPIV truncation compared with A β 42.

After removal of the two first residues by APA and/or the dipeptidyl aminopeptidase activities, the glutamate residue at position 3 is converted into pyroglutamate forming a peptide more resistant to exopeptidasic attack. Several anatomical, pharmacological, and genetic evidences indicated that the enzyme responsible for A β 3-X cyclization was an acyltransferase named glutamyl cyclase (QC) (64–66). First, QC is unevenly distributed in brain and is up-regulated in AD-affected brains (67). Second, QC protein and mRNA expressions colocalize with pE3-XA β in human temporal and entorhinal cortices and, more importantly, correlate better with cognitive alterations assessed by mini-mental state examination than the unmodified A β peptides (40). Third, in animal models, QC overexpression triggers behavioral deficits, whereas conversely, QC depletion rescues defects observed in an AD-transgenic model (68). Fourth, pharmacological blockade of endogenous QC by selective inhibitors reduces the pE3-XA β load in mouse and *Drosophila* AD models and reduces plaques, astrogliosis, and cognitive alterations in AD mouse models (64). It should be added that calcium homeostasis dysregulation, which is commonly observed in cellular AD models, increases QC mRNA expression and activity in neuron-like differentiated SK-N-SH (69). It should be noted that β' cleavage mediated by BACE1 (see above and Fig. 1B) generates a glutamyl residue that can undergo cyclization. Whether GC is involved in pE11-XA β remains to be established.

N-truncated A β 4-X

N-truncated A β (4–42) was one of the first A β -truncated species being reported (70). This truncated form, which starts with a phenylalanine at position 4, was found to be highly abundant in AD brains, aged controls, and vascular dementia (57, 71). It has been demonstrated that this peptide rapidly formed stable aggregates (72). A β 4-X species concentrate in the core of the plaques in several AD mouse models (38). *In vitro* toxicity assays showed that A β (4–42) is as toxic as pE3A β and A β 42 (72), but A β (4–40) was less toxic compared with A β (4–42). In terms of the kinetics of appearance, A β 4-X variants seemed to precede pE3-XA β accumulation in the 5 \times FAD transgenic mouse models (73). *In vivo* studies have indicated that intraventricular injections of A β (4–42) in WT mice tend to affect working memory as assessed with a Y maze test (72). Little is known about the catalytic events responsible for A β 4-X production. One can envision an exopeptidasic release of either glutamate at position 3 that would occur before its cyclization or removal of the pE3 residues once formed. Based on theoretical grounds, two types of peptidases could indeed perform these cleavages. On the one hand, free glutamate residues could be released by acidic peptidase such as aminopeptidase A that is already involved in Asp-1 removal (see above and Ref. 60). On the other hand, there exists two types of pyroglutamyl peptidases I and II that are specialized in the attack of pE residues (61). *In vitro* studies with fluorimetric substrates show that the enzyme cleaves tripeptides where the third Xaa could be indeed interchanged but only TRH natural substrate fulfills the requirement and is cleaved (74). Pyroglutamyl peptidase I only requires a pE residue without clear requirement for residues in the P2 or P3 position. Assessment of its involvement in A β 4-X genesis is still pending.

Biophysical properties of truncated peptides

Amyloid peptide aggregation is a hallmark of AD pathology. However, precise mechanisms leading to seed formation and

accelerated aggregation during the disease progression are still under investigation. Infusion of brain extracts derived from AD transgenic mouse model in WT rodent brains is not *per se* sufficient to trigger A β aggregation (75). Also, aged synthetic A β 40 and A β 42 did not trigger deposits in APP23 transgenic mice (75). This suggests first that in physiological conditions, an efficient clearance mechanism occurs that keeps the A β concentration below its threshold of aggregation. This also indicates that cellular, genetic, or environmental cofactors may govern seeding formation and its acceleration in pathological conditions (75). Interestingly, this increased capability to induce full-length A β seeding has been described for several truncated A β variants such as A β 24 (43) and pE3A β (76).

Glutamate cyclization results in the loss of a negative charge that contributes to the hydrophobicity, resistance to catabolism (77), and aggregation propensity of N-terminally truncated A β species pE11-A β and pE3-A β . pE3-42A β influences misfolding of full-length unmodified A β (76). Moreover, pEA β peptides are known to seed the aggregation of other A β fragments. It has been suggested that the C-terminal part of A β 42 was the locus of interaction with pE3-A β (78). Aside pE-A β variants, A β (4–42) has also a propensity to form very stable aggregates (72). Fast aggregation properties of such fragments have been described *in vitro* (59, 79) as well as *in vivo* in a *Drosophila* model (80).

Increased aggregation propensity and related toxicity have been described also for pyroglutaminylated forms of ADan and ABri, two peptides signing Familial Danish dementia and Familial British dementia, respectively (79, 81, 82).

Neuronal loss and synaptic loss in the hippocampus have been related to the early stages of AD. Several studies have pointed out the effects of truncated A β peptides on cellular toxicity. Some A β species protect against A β 42 toxicity, whereas others appeared to be more aggressive than full-length A β peptides. As described above, A β 34 protects cells overexpressing β APP WT or bearing Swedish mutation from caspase-3-related cell death (37), and therefore, in physiological conditions it could be considered as a beneficial isoform. This protective phenotype could be hampered by A β 34 aggregation. On the contrary, pE3-A β behaves like a noxious peptide. It has a high capacity to induce lipid peroxidation and to influence membrane permeabilization in primary cultured neurons (83). Toxicity of pE3-42A β , assayed on rat cultured hippocampal neurons, appeared to be increased compared with the toxicity of full-length A β (77). More recently, development of transgenic mice expressing pE3A β peptides has helped to demonstrate that such truncated forms are implicated in neuronal loss (58). A *Drosophila* model has been characterized where pE3-42A β peptide is expressed in neurons. Interestingly, the life span of transgenic flies was affected by pE3-42A β . Moreover, expression of the pyroglutaminylated peptide induced behavioral dysfunctions, and toxicity was observed by a disorganization of the eye structure (80). Finally, pE3-42A β has recently been shown to induce synaptic plasticity impairment by different mechanisms than A β 42 and independently of a co-oligomerization process (84). Precise mechanisms involved in pE3-42A β toxicity have still to be addressed.

Truncated A β species in animal models

Several truncated and modified A β species have been found in AD murine models. C-terminally truncated A β 37 and A β 39 are widely expressed in the vasculature of human sporadic and familial AD patients (30). The same study also addressed A β 37 and A β 39 expressions in several transgenic AD mouse models (APP/PS1 Δ E9, 5 \times FAD, PDAPP, APP23, 3 \times TgAD, and APP/PS1KI). However, expression patterns appeared to be drastically distinct. In mice, both C-terminally truncated β -amyloid peptides were found in plaques, but vascular expression was almost absent in all the mouse models tested. Aside from A β 40 and A β 42, several other A β peptides were found in the 5 \times FAD mouse model. The more abundant truncated peptide detected by MS was A β 38, followed by A β (4–42), pE3–42A β , and A β 39. A β (4–40), A β (5–42), and A β 37 were also present but to a lesser extent (30).

A transgenic mouse model expressing the N-truncated A β (4–42) peptide in the brain has been engineered (Tg(4–42)) to investigate the effect of a chronic exposure of this toxic peptide that appears particularly abundant in human brain (57, 70). This transgenic mouse model has been shown to express A β (4–42) in the CA1 region of the hippocampus. However, such expression decreased with aging because of a massive neuronal loss in the region (72) associated with working memory dysfunction. Moreover, neurodegeneration was supported by early astrogliosis and microglial activation at only 2 months of age. The Tg(4–42) mouse model showed spatial memory deficits starting at 5 months of age and being severely impaired at 6 months of age (85). In this model, A β (4–42) hippocampal expression correlates with a significant neuron loss in the CA1 layer of the hippocampus (85).

Another transgenic mouse model, with a glutamine instead of the glutamate at position 3 of the A β peptide, has been generated to examine the effect of cyclization on pathology development (86). The TBA42 mice that do not express β APP present a very rapid onset of symptoms, accumulate pE3-A β , and harbor microglial activation and impaired LTP (58). These mice showed an age-dependent neuronal loss in the CA1 region of the hippocampus. TBA42 mice were then crossed to 5 \times FAD to engineer the FAD42 mouse model, which at 6 months of age showed an aggravated phenotype compared with the 5 \times FAD mouse model (87). This set of data corroborates the view of a pathological influence of pE3-A β species.

A β truncated species as biomarkers

Almost all truncated A β species, yielded by primary cleavages of β APP or secondary cleavages directly on A β , have been detected in the CSFs and therefore could represent an interest as putative early biomarkers. Thirteen C-terminally truncated species have been detected in CSF (88, 89). Quantitation of several A β species reveals, for example, that A β (1–38) decreases in AD fluids compared with controls CSF (39). It appears that the pattern of truncated A β could help differentiate between some neurological disorders. For example, A β (2–42) levels in cerebrospinal fluids are decreased in AD, although they are unchanged in fronto-temporal dementia (90). A β (11-X) and A β (17-X) peptides are of interest as new

biomarkers for MCI detection because they have been identified in cerebrospinal fluids in patients with very early MCI (23).

Pharmaceutical strategies

As discussed in this Minireview, truncated amyloid species and pyroglutamate A β are very toxic forms of A β , and thus, they correspond to potential therapeutic targets. One of the advantages of a therapeutic strategy aimed at abolishing truncated A β species-related pathology relies on the fact that such an approach will not interfere with any physiological function of soluble full-length A β (40, 60, 91). Accordingly, two main classical strategies could be envisioned that concern immunotherapy aimed at neutralizing truncated or modified A β or inhibitors of enzymes implicated in truncation and cyclization.

A specific antibody, targeting A β 4-X variants (NT4X-167), has been developed and characterized in transgenic mouse models as well as sporadic and FAD patients (73). Although the NT4X-167 antibody reacts with senile plaques in 5 \times FAD mouse models, a different pattern was found in AD brains where staining was observed in blood vessels as in Down's syndrome cases (92). Considering also A β (4–42) as a target for a therapeutic strategy appeared relevant because passive immunization with NT4X antibody decreases neuronal loss in CA1, rescues spatial memory deficits in Tg(4–42) mouse model, and reduced amyloid plaques in 5 \times FAD mice (85). A chronic passive immunization against pE3 in the APP^{sw}/PS1 Δ E9 transgenic mouse model also triggers beneficial effects on plaque deposition, cerebral amyloid angiopathy, as well as gliosis (93). Another pharmaceutical strategy relies on the effect of QC inhibition to prevent formation of pyroglutaminylated A β species. Several QC inhibitors are actually in development (64, 94). Obviously, a pre-requirement of these pharmacological approaches remains the firm identification of enzymes responsible for fragment formation. As stated above, in some cases, this identification is still awaited. Additional problems to overcome could be related to the lack of exclusive specificity displayed by these peptidases (61). Thus, close examination of the potential side-effects linked to proteolysis of additional substrates, a key feature that was initially underestimated when γ -secretase inhibitors were designed and envisioned as therapeutic probes, will be a prior and redhibitory requirement.

Conclusion

The monitoring of full-length A β peptides (A β (1–40) and A β (1–42)) as biomarkers of AD pathology has to be deeply reconsidered with respect to the fact that many additional A β -related species are generated and recovered in biological fluids.

Secondary cleavages onto a canonical A β peptide sequence have only been considered for a while as a clearance paradigm, aimed at depleting A β (1–40) and A β (1–42) and generating biologically inert bypass products. More likely, it appears that it gives rise to new players with potential pathological properties. Many A β truncated peptides that aggregate or favor seed aggregation yield variable oligomer profiles. Whether this represents a pathogenic signature accounting for specific differences observed in variable settings and the progression of AD in patients has to be envisioned.

References

- Checler, F. (1995) Processing of the β -amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **65**, 1431–1444 [Medline](#)
- Pardossi-Piquard, R., Petit, A., Kawarai, T., Sunyach, C., Alves da Costa, C., Vincent, B., Ring, S., D'Adamio, L., Shen, J., Müller, U., St George-Hyslop, P., and Checler, F. (2005) Presenilin-dependent transcriptional control of the A β -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of β APP and APLP. *Neuron* **46**, 541–554 [CrossRef Medline](#)
- Pardossi-Piquard, R., and Checler, F. (2012) The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J. Neurochem.* **120**, (suppl. 1), 109–124 [CrossRef Medline](#)
- Catalano, S. M., Dodson, E. C., Henze, D. A., Joyce, J. G., Krafft, G. A., and Kinney, G. G. (2006) The role of amyloid- β derived diffusible ligands (ADDLs) in Alzheimer's disease. *Curr. Top. Med. Chem.* **6**, 597–608 [CrossRef Medline](#)
- Cissé, M., Duplan, E., Lorivel, T., Dunys, J., Bauer, C., Meckler, X., Gerakis, Y., Lauritzen, I., and Checler, F. (2017) The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model. *Mol. Psychiatry* **22**, 1562–1575 [CrossRef Medline](#)
- Walsh, D. M., Klyubin, I., Fadeeva, J. V., Cullen, W. K., Anwyl, R., Wolfe, M. S., Rowan, M. J., and Selkoe, D. J. (2002) Naturally secreted oligomers of amyloid β protein potently inhibit hippocampal long-term potentiation *in vivo*. *Nature* **416**, 535–539 [CrossRef Medline](#)
- Haass, C., and Selkoe, D. J. (2007) Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8**, 101–112 [CrossRef Medline](#)
- Lesné, S., Koh, M. T., Kotilinek, L., Kaye, R., Glabe, C. G., Yang, A., Gallagher, M., and Ashe, K. H. (2006) A specific amyloid- β protein assembly in the brain impairs memory. *Nature* **440**, 352–357 [CrossRef Medline](#)
- Jonsson, T., Atwal, J. K., Steinberg, S., Snaedal, J., Jonsson, P. V., Björnsson, S., Stefansson, H., Sulem, P., Gudbjartsson, D., Maloney, J., Hoyte, K., Gustafson, A., Liu, Y., Lu, Y., Bhargava, T., *et al.* (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* **488**, 96–99 [CrossRef Medline](#)
- Benilova, I., Gallardo, R., Ungureanu, A. A., Castillo Cano, V., Snellinx, A., Ramakers, M., Bartic, C., Rousseau, F., Schymkowitz, J., and De Strooper, B. (2014) The Alzheimer disease protective mutation A2T modulates kinetic and thermodynamic properties of amyloid- β (A β) aggregation. *J. Biol. Chem.* **289**, 30977–30989 [CrossRef Medline](#)
- Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J. D., Ranaldi, S., Fraser, P., St-George-Hyslop, P., Le Thuc, O., Espin, V., Chami, L., Dunys, J., and Checler, F. (2012) The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **32**, 16243–16255a [CrossRef Medline](#)
- Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Pagnotta, S., Biferi, M. G., Barkats, M., Lacor, P., Klein, W., Bauer, C., and Checler, F. (2016) Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol.* **132**, 257–276 [CrossRef Medline](#)
- Nixon, R. A. (2017) Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J.* **31**, 2729–2743 [CrossRef Medline](#)
- Willem, M., Tahirovic, S., Busche, M. A., Ovsepian, S. V., Chafai, M., Kootar, S., Hornburg, D., Evans, L. D., Moore, S., Daria, A., Hampel, H., Müller, V., Giudici, C., Nuscher, B., Wenninger-Weinzierl, A., *et al.* (2015) η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **526**, 443–447 [CrossRef Medline](#)
- Baranger, K., Bonnet, A. E., Girard, S. D., Paumier, J. M., García-González, L., Elmanaa, W., Bernard, A., Charrat, E., Stephan, D., Bauer, C., Moschke, K., Lichtenthaler, S. F., Roman, F. S., Checler, F., Khrestchatsky, M., and Rivera, S. (2016) MT5–MMP promotes Alzheimer's pathogenesis in the frontal cortex of 5 \times FAD mice and APP trafficking *in vitro*. *Front. Mol. Neurosci.* **9**, 163 [Medline](#)
- Baranger, K., Marchalant, Y., Bonnet, A. E., Crouzin, N., Carrete, A., Paumier, J. M., Py, N. A., Bernard, A., Bauer, C., Charrat, E., Moschke, K.,

MINIREVIEW: Truncated A β species in Alzheimer's disease

- Seiki, M., Vignes, M., Lichtenthaler, S. F., Checler, F., *et al.* (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. *Cell. Mol. Life Sci.* **73**, 217–236 [CrossRef Medline](#)
17. Vassar, R., Bennett, B. D., Babu-Khan, S., Kahn, S., Mendiaz, E. A., Denis, P., Teplow, D. B., Ross, S., Amarante, P., Loeloff, R., Luo, Y., Fisher, S., Fuller, J., Edenson, S., Lile, J., *et al.* (1999) β -Secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* **286**, 735–741 [CrossRef Medline](#)
18. Huse, J. T., Liu, K., Pijak, D. S., Carlin, D., Lee, V. M., and Doms, R. W. (2002) β -Secretase processing in the trans-Golgi network preferentially generates truncated amyloid species that accumulate in Alzheimer's disease brain. *J. Biol. Chem.* **277**, 16278–16284 [CrossRef Medline](#)
19. Bertram, L., and Tanzi, R. E. (2012) The genetics of Alzheimer's disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **107**, 79–100 [CrossRef Medline](#)
20. Selkoe, D. J., and Schenk, D. (2003) Alzheimer's disease: molecular understanding predicts amyloid-based therapeutics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **43**, 545–584 [CrossRef Medline](#)
21. Ancolio, K., Dumanchin, C., Barelli, H., Warter, J. M., Brice, A., Campion, D., Frébourg, T., and Checler, F. (1999) Unusual phenotypic alteration of β amyloid precursor protein (β APP) maturation by a new Val-715 \rightarrow Met β APP-770 mutation responsible for probable early-onset Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 4119–4124 [CrossRef Medline](#)
22. Russo, C., Schettini, G., Saito, T. C., Hulette, C., Lippa, C., Lannfelt, L., Ghetti, B., Gambetti, P., Tabaton, M., and Teller, J. K. (2000) Presenilin-1 mutations in Alzheimer's disease. *Nature* **405**, 531–532 [CrossRef Medline](#)
23. Abraham, J. D., Promé, S., Salvétat, N., Rubrecht, L., Cobo, S., du Paty, E., Galéa, P., Mathieu-Dupas, E., Ranaldi, S., Caillava, C., Crémer, G. A., Rieunier, F., Robert, P., Molina, F., Laune, D., Checler, F., and Fareh, J. (2013) Cerebrospinal A β 11-X and 17-X levels as indicators of mild cognitive impairment and patients' stratification in Alzheimer's disease. *Transl. Psychiatry* **3**, e281 [CrossRef Medline](#)
24. Ranaldi, S., Caillava, C., Promé, S., Rubrecht, L., Cobo, S., Salvétat, N., du Paty, E., Galea, P., Aldrian, G., Le Nguyen, D., Krolak-Salmon, P., Molina, F., Laune, D., Checler, F., Fareh, J., and Abraham, J. D. (2013) N-truncated A β peptides in complex fluids unraveled by new specific immunoassays. *Neurobiol. Aging* **34**, 523–539 [CrossRef Medline](#)
25. Kuperstein, I., Broersen, K., Benilova, I., Rozenski, J., Jonckheere, W., Debulpaep, M., Vandersteen, A., Segers-Nolten, I., Van Der Werf, K., Subramaniam, V., Braeken, D., Callewaert, G., Bartic, C., D'Hooge, R., Martins, I. C., *et al.* (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease A β peptides is induced by small changes in the A β 42 to A β 40 ratio. *EMBO J.* **29**, 3408–3420 [CrossRef Medline](#)
26. Wiltfang, J., Esselmann, H., Bibl, M., Smirnov, A., Otto, M., Paul, S., Schmidt, B., Klafki, H. W., Maler, M., Dyrks, T., Bienert, M., Beyermann, M., Rütther, E., and Kornhuber, J. (2002) Highly conserved and disease-specific patterns of carboxy terminally truncated A β peptides 1–37/38/39 in addition to (1–40)/42 in Alzheimer's disease and in patients with chronic neuroinflammation. *J. Neurochem.* **81**, 481–496 [CrossRef Medline](#)
27. Matsumura, N., Takami, M., Okochi, M., Wada-Kakuda, S., Fujiwara, H., Tagami, S., Funamoto, S., Ihara, Y., and Morishima-Kawashima, M. (2014) γ -Secretase associated with lipid rafts: multiple interactive pathways in the stepwise processing of β -carboxyl-terminal fragment. *J. Biol. Chem.* **289**, 5109–5121 [CrossRef Medline](#)
28. Weggen, S., Eriksen, J. L., Das, P., Sagi, S. A., Wang, R., Pietrzik, C. U., Findlay, K. A., Smith, T. E., Murphy, M. P., Bulter, T., Kang, D. E., Marquez-Sterling, N., Golde, T. E., and Koo, E. H. (2001) A subset of NSAIDs lower amyloidogenic A β 42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **414**, 212–216 [CrossRef Medline](#)
29. Page, R. M., Baumann, K., Tomioka, M., Pérez-Revuelta, B. I., Fukumori, A., Jacobsen, H., Flohr, A., Luebbers, T., Ozmen, L., Steiner, H., and Haass, C. (2008) Generation of A β 38 and A β 42 is independently and differentially affected by familial Alzheimer disease-associated presenilin mutations and γ -secretase modulation. *J. Biol. Chem.* **283**, 677–683 [CrossRef Medline](#)
30. Reinert, J., Richard, B. C., Klafki, H. W., Friedrich, B., Bayer, T. A., Wiltfang, J., Kovacs, G. G., Ingelsson, M., Lannfelt, L., Paetau, A., Bergquist, J., and Wirths, O. (2016) Deposition of C-terminally truncated A β species A β 37 and A β 39 in Alzheimer's disease and transgenic mouse models. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 24 [CrossRef Medline](#)
31. Moore, B. D., Martin, J., de Mena, L., Sanchez, J., Cruz, P. E., Ceballos-Diaz, C., Ladd, T. B., Ran, Y., Levites, Y., Kukar, T. L., Kurian, J. J., McKenna, R., Koo, E. H., Borchelt, D. R., Janus, C., *et al.* (2018) Short A β peptides attenuate A β 42 toxicity *in vivo*. *J. Exp. Med.* **215**, 283–301 [CrossRef Medline](#)
32. Fluhrer, R., Multhaup, G., Schlicksupp, A., Okochi, M., Takeda, M., Lam-mich, S., Willem, M., Westmeyer, G., Bode, W., Walter, J., and Haass, C. (2003) Identification of a β -secretase activity, which truncates amyloid β -peptide after its presenilin-dependent generation. *J. Biol. Chem.* **278**, 5531–5538 [CrossRef Medline](#)
33. Shi, X. P., Tugusheva, K., Bruce, J. E., Lucka, A., Wu, G. X., Chen-Dodson, E., Price, E., Li, Y., Xu, M., Huang, Q., Sardana, M. K., and Hazuda, D. J. (2003) β -Secretase cleavage at amino acid residue 34 in the amyloid β peptide is dependent upon gamma-secretase activity. *J. Biol. Chem.* **278**, 21286–21294 [CrossRef Medline](#)
34. Vandermeeren, M., Geraerts, M., Pype, S., Dillen, L., Van Hove, C., and Mercken, M. (2001) The functional γ -secretase inhibitor prevents production of amyloid β 1–34 in human and murine cell lines. *Neurosci. Lett.* **315**, 145–148 [CrossRef Medline](#)
35. Mattsson, N., Rajendran, L., Zetterberg, H., Gustavsson, M., Andreasson, U., Olsson, M., Brinkmalm, G., Lundkvist, J., Jacobson, L. H., Perrot, L., Neumann, U., Borghys, H., Mercken, M., Dhuyvetter, D., Jeppsson, F., *et al.* (2012) BACE1 inhibition induces a specific cerebrospinal fluid β -amyloid pattern that identifies drug effects in the central nervous system. *PLoS ONE* **7**, e31084 [CrossRef Medline](#)
36. Hernandez-Guillamon, M., Mawhirt, S., Blais, S., Montaner, J., Neubert, T. A., Rostagno, A., and Ghiso, J. (2015) Sequential amyloid- β degradation by the matrix metalloproteases MMP-2 and MMP-9. *J. Biol. Chem.* **290**, 15078–15091 [CrossRef Medline](#)
37. Caillava, C., Ranaldi, S., Lauritzen, I., Bauer, C., Fareh, J., Abraham, J. D., and Checler, F. (2014) Study on A β 34 biology and detection in transgenic mice brains. *Neurobiol. Aging* **35**, 1570–1581 [CrossRef Medline](#)
38. Cabrera, E., Mathews, P., Mezhericher, E., Beach, T. G., Deng, J., Neubert, T. A., Rostagno, A., and Ghiso, J. (2018) A β truncated species: implications for brain clearance mechanisms and amyloid plaque deposition. *Biochim. Biophys. Acta* **1864**, 208–225 [CrossRef Medline](#)
39. Maddalena, A. S., Papassotiropoulos, A., Gonzalez-Agosti, C., Signorell, A., Hegi, T., Pasch, T., Nitsch, R. M., and Hock, C. (2004) Cerebrospinal fluid profile of amyloid β peptides in patients with Alzheimer's disease determined by protein biochip technology. *Neurodegener. Dis.* **1**, 231–235 [CrossRef Medline](#)
40. Chami, L., Buggia-Prévo, V., Duplan, E., Del Prete, D., Chami, M., Peyron, J. F., and Checler, F. (2012) Nuclear factor- κ B regulates β APP and β - and γ -secretases differently at physiological and supraphysiological A β concentrations. *J. Biol. Chem.* **287**, 24573–24584 [CrossRef Medline](#)
41. Marr, R. A., Rockenstein, E., Mukherjee, A., Kindy, M. S., Hersh, L. B., Gage, F. H., Verma, I. M., and Masliah, E. (2003) Nephrilysin gene transfer reduces human amyloid pathology in transgenic mice. *J. Neurosci.* **23**, 1992–1996 [CrossRef Medline](#)
42. Vassar, R., Kovacs, D. M., Yan, R., and Wong, P. C. (2009) The β -secretase enzyme BACE in health and Alzheimer's disease: regulation, cell biology, function, and therapeutic potential. *J. Neurosci.* **29**, 12787–12794 [CrossRef Medline](#)
43. Mazzitelli, S., Filipello, F., Rasile, M., Lauranzano, E., Starvaggi-Cucuzza, C., Tamborini, M., Pozzi, D., Barajon, I., Giorgino, T., Nataello, A., and Matteoli, M. (2016) Amyloid- β 1–24 C-terminal truncated fragment promotes amyloid- β (1–42) aggregate formation in the healthy brain. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 110 [CrossRef Medline](#)
44. Wiltfang, J., Esselmann, H., Cupers, P., Neumann, M., Kretschmar, H., Beyermann, M., Schleuder, D., Jahn, H., Rütther, E., Kornhuber, J., Annaert, W., De Strooper, B., and Saftig, P. (2001) Elevation of β -amyloid peptide 2–42 in sporadic and familial Alzheimer's disease and its generation in PS1 knockout cells. *J. Biol. Chem.* **276**, 42645–42657 [CrossRef Medline](#)

45. De Strooper, B., Saftig, P., Craessaerts, K., Vanderstichele, H., Guhde, G., Annaert, W., Von Figura, K., and Van Leuven, F. (1998) Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **391**, 387–390 [CrossRef Medline](#)
46. Sannerud, R., Esselens, C., Ejsmont, P., Mattered, R., Rochin, L., Tharkeshwar, A. K., De Baets, G., De Wever, V., Habets, R., Baert, V., Vermeire, W., Michiels, C., Groot, A. J., Wouters, R., Dillen, K., *et al.* (2016) Restricted location of PSEN2/ γ -secretase determines substrate specificity and generates an intracellular A β pool. *Cell* **166**, 193–208 [CrossRef Medline](#)
47. Meckler, X., and Checler, F. (2016) Presenilin 1 and presenilin 2 target γ -secretase complexes to distinct cellular compartments. *J. Biol. Chem.* **291**, 12821–12837 [CrossRef Medline](#)
48. Armogida, M., Petit, A., Vincent, B., Scarzello, S., da Costa, C. A., and Checler, F. (2001) Endogenous β -amyloid production in presenilin-deficient embryonic mouse fibroblasts. *Nat. Cell Biol.* **3**, 1030–1033 [CrossRef Medline](#)
49. Wilson, C. A., Doms, R. W., and Lee, V. M. (2003) Distinct presenilin-dependent and presenilin-independent γ -secretases are responsible for total cellular A β production. *J. Neurosci. Res.* **74**, 361–369 [CrossRef Medline](#)
50. Wilson, C. A., Doms, R. W., Zheng, H., and Lee, V. M. (2002) Presenilins are not required for A β 42 production in the early secretory pathway. *Nat. Neurosci.* **5**, 849–855 [CrossRef Medline](#)
51. Lai, M. T., Crouthamel, M. C., DiMuzio, J., Pietrak, B. L., Donoviel, D. B., Bernstein, A., Gardell, S. J., Li, Y. M., and Hazuda, D. (2006) A presenilin-independent aspartyl protease prefers the γ -42 site cleavage. *J. Neurochem.* **96**, 118–125 [CrossRef Medline](#)
52. Sevalle, J., Ayril, E., Hernandez, J. F., Martinez, J., and Checler, F. (2009) Pharmacological evidences for DFK167-sensitive presenilin-independent γ -secretase-like activity. *J. Neurochem.* **110**, 275–283 [CrossRef Medline](#)
53. Saido, T. C., Iwatsubo, T., Mann, D. M., Shimada, H., Ihara, Y., and Kawashima, S. (1995) Dominant and differential deposition of distinct β -amyloid peptide species, A β N3(pE), in senile plaques. *Neuron* **14**, 457–466 [CrossRef Medline](#)
54. Iwatsubo, T., Saido, T. C., Mann, D. M., Lee, V. M., and Trojanowski, J. Q. (1996) Full-length amyloid- β (1–42)(43) and amino-terminally modified and truncated amyloid- β 42(43) deposit in diffuse plaques. *Am. J. Pathol.* **149**, 1823–1830 [Medline](#)
55. Kuo, Y. M., Emmerling, M. R., Woods, A. S., Cotter, R. J., and Roher, A. E. (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of A β 3-pyroglutamate peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **237**, 188–191 [CrossRef Medline](#)
56. Hosoda, R., Saido, T. C., Otvos, L., Jr., Arai, T., Mann, D. M., Lee, V. M., Trojanowski, J. Q., and Iwatsubo, T. (1998) Quantification of modified amyloid β peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**, 1089–1095 [CrossRef Medline](#)
57. Portelius, E., Bogdanovic, N., Gustavsson, M. K., Volkman, I., Brinkmann, G., Zetterberg, H., Winblad, B., and Blennow, K. (2010) Mass spectrometric characterization of brain amyloid β isoform signatures in familial and sporadic Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **120**, 185–193 [CrossRef Medline](#)
58. Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Becker, A., Bäuscher, C., Kohlmann, S., Sedmeier, R., Raber, K. A., Cynis, H., Rönicke, R., Reyman, K. G., Petrasch-Parwez, E., Hartlage-Rübsamen, M., Waniek, A., Rossner, S., *et al.* (2011) Selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice expressing small amounts of truncated A β is induced by pyroglutamate-A β formation. *J. Neurosci.* **31**, 12790–12801 [CrossRef Medline](#)
59. Dammers, C., Schwarten, M., Buell, A. K., and Willbold, D. (2017) Pyroglutamate-modified A β (3–42) affects aggregation kinetics of A β (1–42) by accelerating primary and secondary pathways. *Chem. Sci.* **8**, 4996–5004 [CrossRef Medline](#)
60. Sevalle, J., Amoyel, A., Robert, P., Fournié-Zaluski, M. C., Roques, B., and Checler, F. (2009) Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid β -peptide. *J. Neurochem.* **109**, 248–256 [CrossRef Medline](#)
61. Checler, F. (1994) in *Methods in Neurotransmitters and Neuropeptides Research* (Parvez, S. H., and Nagatsu, N. T., eds) Part 2, pp. 375–418, Elsevier, Amsterdam
62. Schilling, S., Hoffmann, T., Manhart, S., Hoffmann, M., and Demuth, H. U. (2004) Glutaminyl cyclases unfold glutamyl cyclase activity under mild acid conditions. *FEBS Lett.* **563**, 191–196 [CrossRef Medline](#)
63. Antonyan, A., Schlenzig, D., Schilling, S., Naumann, M., Sharoyan, S., Mardanyan, S., and Demuth, H. U. (2018) Concerted action of dipeptidyl peptidase IV and glutaminyl cyclase results in formation of pyroglutamate-modified amyloid peptides *in vitro*. *Neurochem. Int.* **113**, 112–119 [CrossRef Medline](#)
64. Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., Jagla, W., Schlenzig, D., Lindner, C., Rudolph, T., Reuter, G., *et al.* (2008) Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate A β and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat. Med.* **14**, 1106–1111 [CrossRef Medline](#)
65. Schilling, S., Appl, T., Hoffmann, T., Cynis, H., Schulz, K., Jagla, W., Friedrich, D., Wermann, M., Buchholz, M., Heiser, U., von Hörsten, S., and Demuth, H. U. (2008) Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-A β formation after intracortical/hippocampal microinjection *in vivo/in situ*. *J. Neurochem.* **106**, 1225–1236 [CrossRef Medline](#)
66. Cynis, H., Scheel, E., Saido, T. C., Schilling, S., and Demuth, H. U. (2008) Amyloidogenic processing of amyloid precursor protein: evidence of a pivotal role of glutaminyl cyclase in generation of pyroglutamate-modified amyloid- β . *Biochemistry* **47**, 7405–7413 [CrossRef Medline](#)
67. Morawski, M., Schilling, S., Kreuzberger, M., Waniek, A., Jäger, C., Koch, B., Cynis, H., Kehlen, A., Arendt, T., Hartlage-Rübsamen, M., Demuth, H. U., and Rossner, S. (2014) Glutaminyl cyclase in human cortex: correlation with (pGlu)-amyloid- β load and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* **39**, 385–400 [CrossRef Medline](#)
68. Jawhar, S., Wirths, O., Schilling, S., Graubner, S., Demuth, H. U., and Bayer, T. A. (2011) Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A β formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5 \times FAD mice. *J. Biol. Chem.* **286**, 4454–4460 [CrossRef Medline](#)
69. De Kimpe, L., Bennis, A., Zwart, R., van Haastert, E. S., Hoozemans, J. J., and Scheper, W. (2012) Disturbed Ca²⁺ homeostasis increases glutaminyl cyclase expression; connecting two early pathogenic events in Alzheimer's disease *in vitro*. *PLoS ONE* **7**, e44674 [CrossRef Medline](#)
70. Masters, C. L., Simms, G., Weinman, N. A., Multhaup, G., McDonald, B. L., and Beyreuther, K. (1985) Amyloid plaque core protein in Alzheimer disease and Down syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **82**, 4245–4249 [CrossRef Medline](#)
71. Lewis, H., Behr, D., Cookson, N., Oakley, A., Piggott, M., Morris, C. M., Jaros, E., Perry, R., Ince, P., Kenny, R. A., Ballard, C. G., Shearman, M. S., and Kalaria, R. N. (2006) Quantification of Alzheimer pathology in ageing and dementia: age-related accumulation of amyloid- β (42) peptide in vascular dementia. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **32**, 103–118 [CrossRef Medline](#)
72. Bouter, Y., Dietrich, K., Wittnam, J. L., Rezaei-Ghaleh, N., Pillot, T., Papot-Couturier, S., Lefebvre, T., Sprenger, F., Wirths, O., Zweckstetter, M., and Bayer, T. A. (2013) N-truncated amyloid β (A β) (4–42) forms stable aggregates and induces acute and long-lasting behavioral deficits. *Acta Neuropathol.* **126**, 189–205 [CrossRef Medline](#)
73. Antonios, G., Saiepour, N., Bouter, Y., Richard, B. C., Paetau, A., Verkoniemi-Ahola, A., Lannfelt, L., Ingelsson, M., Kovacs, G. G., Pillot, T., Wirths, O., and Bayer, T. A. (2013) N-truncated A β starting with position four: early intraneuronal accumulation and rescue of toxicity using NT4X-167, a novel monoclonal antibody. *Acta Neuropathol. Commun.* **1**, 56 [CrossRef Medline](#)
74. Bauer, K., and Nowak, P. (1979) Characterization of a thyrolyberin-degrading serum enzyme catalyzing the hydrolysis of thyrolyberin at the pyroglutamyl-histidine bond. *Eur. J. Biochem.* **99**, 239–246 [CrossRef Medline](#)
75. Meyer-Luehmann, M., Coomaraswamy, J., Bolmont, T., Kaeser, S., Schaefer, C., Kilger, E., Neuenschwander, A., Abramowski, D., Frey, P., Jaton, A. L., Vigouret, J. M., Paganetti, P., Walsh, D. M., Mathews, P. M., Ghiso, J., *et al.* (2006) Exogenous induction of cerebral β -amyloidogenesis is governed by agent and host. *Science* **313**, 1781–1784 [CrossRef Medline](#)
76. Galante, D., Ruggeri, F. S., Dietler, G., Pellistri, F., Gatta, E., Corsaro, A., Florio, T., Perico, A., and D'Arrigo, C. (2016) A critical concentration of

MINIREVIEW: Truncated A β species in Alzheimer's disease

- N-terminal pyroglutamylated amyloid β drives the misfolding of Ab(1–42) into more toxic aggregates. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **79**, 261–270 [CrossRef Medline](#)
77. Russo, C., Violani, E., Salis, S., Venezia, V., Dolcini, V., Damonte, G., Benatti, U., D'Arrigo, C., Patrone, E., Carlo, P., and Schettini, G. (2002) Pyroglutamate-modified amyloid β -peptides—A β N3(pE)—strongly affect cultured neuron and astrocyte survival. *J. Neurochem.* **82**, 1480–1489 [CrossRef Medline](#)
78. Tomaselli, S., Pagano, K., D'Arrigo, C., Molinari, H., and Ragona, L. (2017) Evidence of molecular interactions of A β (1–42) with N-terminal truncated β amyloids by NMR. *ACS Chem. Neurosci.* **8**, 759–765 [CrossRef Medline](#)
79. Schilling, S., Lauber, T., Schaupp, M., Manhart, S., Scheel, E., Böhm, G., and Demuth, H. U. (2006) On the seeding and oligomerization of pGlu-amyloid peptides (*in vitro*). *Biochemistry* **45**, 12393–12399 [CrossRef Medline](#)
80. Sofola-Adesakin, O., Khericha, M., Snoeren, I., Tsuda, L., and Partridge, L. (2016) pGluA β increases accumulation of A β *in vivo* and exacerbates its toxicity. *Acta Neuropathol. Commun.* **4**, 109 [CrossRef Medline](#)
81. Saul, A., Lashley, T., Revesz, T., Holton, J., Ghiso, J. A., Coomaraswamy, J., and Wirths, O. (2013) Abundant pyroglutamate-modified A β and ADan peptides in extracellular and vascular amyloid deposits in Familial British and Danish dementias. *Neurobiol. Aging* **34**, 1416–1425 [CrossRef Medline](#)
82. Tomidokoro, Y., Lashley, T., Rostagno, A., Neubert, T. A., Bojsen-Møller, M., Braendgaard, H., Plant, G., Holton, J., Frangione, B., Révész, T., and Ghiso, J. (2005) Familial Danish dementia: co-existence of Danish and Alzheimer amyloid subunits (ADan AND A β) in the absence of compact plaques. *J. Biol. Chem.* **280**, 36883–36894 [CrossRef Medline](#)
83. Gunn, A. P., Wong, B. X., Johanssen, T., Griffith, J. C., Masters, C. L., Bush, A. I., Barnham, K. J., Duce, J. A., and Cherny, R. A. (2016) Amyloid- β peptide A β 3pE-42 induces lipid peroxidation, membrane permeabilization, and calcium influx in neurons. *J. Biol. Chem.* **291**, 6134–6145 [CrossRef Medline](#)
84. Grochowska, K. M., Yuanxiang, P., Bär, J., Raman, R., Brugal, G., Sahu, G., Schweizer, M., Bikbaev, A., Schilling, S., Demuth, H. U., and Kreutz, M. R. (2017) Posttranslational modification impact on the mechanism by which amyloid- β induces synaptic dysfunction. *EMBO Rep.* **18**, 962–981 [CrossRef Medline](#)
85. Antonios, G., Borgers, H., Richard, B. C., Brauss, A., Meissner, J., Weggen, S., Pena, V., Pillot, T., Davies, S. L., Bakrania, P., Matthews, D., Brownless, J., Bouter, Y., and Bayer, T. A. (2015) Alzheimer therapy with an antibody against N-terminal A β 4-X and pyroglutamate A β 3-X. *Sci. Rep.* **5**, 17338 [CrossRef Medline](#)
86. Wirths, O., Breyhan, H., Cynis, H., Schilling, S., Demuth, H. U., and Bayer, T. A. (2009) Intraneuronal pyroglutamate-A β 3–42 triggers neurodegeneration and lethal neurological deficits in a transgenic mouse model. *Acta Neuropathol.* **118**, 487–496 [CrossRef Medline](#)
87. Wittnam, J. L., Portelius, E., Zetterberg, H., Gustavsson, M. K., Schilling, S., Koch, B., Demuth, H. U., Blennow, K., Wirths, O., and Bayer, T. A. (2012) Pyroglutamate amyloid β (A β) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J. Biol. Chem.* **287**, 8154–8162 [CrossRef Medline](#)
88. Portelius, E., Zetterberg, H., Andreasson, U., Brinkmalm, G., Andreassen, N., Wallin, A., Westman-Brinkmalm, A., and Blennow, K. (2006) An Alzheimer's disease-specific β -amyloid fragment signature in cerebrospinal fluid. *Neurosci. Lett.* **409**, 215–219 [CrossRef Medline](#)
89. Portelius, E., Westman-Brinkmalm, A., Zetterberg, H., and Blennow, K. (2006) Determination of β -amyloid peptide signatures in cerebrospinal fluid using immunoprecipitation-mass spectrometry. *J. Proteome Res.* **5**, 1010–1016 [CrossRef Medline](#)
90. Bibl, M., Gallus, M., Welge, V., Esselmann, H., Wolf, S., Rütger, E., and Wiltfang, J. (2012) Cerebrospinal fluid amyloid- β 2–42 is decreased in Alzheimer's, but not in frontotemporal dementia. *J. Neural Transm.* **119**, 805–813 [CrossRef Medline](#)
91. Puzzo, D., Privitera, L., Leznik, E., Fà, M., Staniszewski, A., Palmeri, A., and Arancio, O. (2008) Picomolar amyloid- β positively modulates synaptic plasticity and memory in hippocampus. *J. Neurosci.* **28**, 14537–14545 [CrossRef Medline](#)
92. Wirths, O., Walter, S., Kraus, I., Klafki, H. W., Stazi, M., Oberstein, T. J., Ghiso, J., Wiltfang, J., Bayer, T. A., and Weggen, S. (2017) N-truncated A β 4-x peptides in sporadic Alzheimer's disease cases and transgenic Alzheimer mouse models. *Alzheimers Res. Ther.* **9**, 80 [CrossRef Medline](#)
93. Frost, J. L., Liu, B., Kleinschmidt, M., Schilling, S., Demuth, H. U., and Lemere, C. A. (2012) Passive immunization against pyroglutamate-3 amyloid- β reduces plaque burden in Alzheimer-like transgenic mice: a pilot study. *Neurodegener. Dis.* **10**, 265–270 [CrossRef Medline](#)
94. Buchholz, M., Heiser, U., Schilling, S., Niestroj, A. J., Zunkel, K., and Demuth, H. U. (2006) The first potent inhibitors for human glutaminyl cyclase: synthesis and structure-activity relationship. *J. Med. Chem.* **49**, 664–677 [CrossRef Medline](#)

B.ARTICLE 1 - Axe1 : Objectif et résumé

« L'Aminopeptidase A contribue aux défauts biochimiques, anatomiques et cognitifs dans le modèle murin 3xTg-AD et s'élève dans les cerveaux sporadiques de la maladie d'Alzheimer à un stade précoce. »

Aminopeptidase A contributes to biochemical, anatomical and cognitive defects in Alzheimer's disease mice and is increased at early stage of sporadic Alzheimer's disease

A.Valverde, J.Dunys, D.Debayle, T.Lorivel, AS.Gay, B.Roques, S.Gervais, M.Chami et F.Checler

Préparation de soumission dans Acta neuropathologica.

L'objectif de ce projet était d'identifier le rôle exact de l'Aminopeptidase A (APA) dans la troncation du peptide A β dans sa région N-terminale et d'analyser son niveau d'implication dans les caractéristiques anatomiques et symptomatiques de la maladie d'Alzheimer. Auparavant, le Dr Jean Sevalle a démontré que l'inhibition de cet enzyme, dans des cellules HEK surexprimant la β APP portant la mutation suédoise, augmente l'immunoréactivité de l'A β commençant spécifiquement par l'acide aspartyl en position 1 (Anticorps FCA18).

Dans cet article, nous confirmons l'implication d'APA dans la maladie d'Alzheimer dans différents modèles (*in vitro*, *ex-vivo* et *in vivo*) et aspects de la pathologie. Tout d'abord, nous avons vérifié la formation de l'A β_{2-40} par spectrométrie de masse pour confirmer la base de notre hypothèse. Par la suite, nous avons continué dans 2 axes différents pour identifier au mieux les conséquences d'une invalidation partielle de cet enzyme. Tout d'abord, nous avons utilisé le RB150, qui nous a été fourni par collaboration avec le Pr Bernard Roques, pro-drogue dirigée contre l'Aminopeptidase A au niveau cérébral. Cet inhibiteur nous a permis d'étudier les conséquences d'une diminution de l'activité enzymatique d'APA sur des coupes organotypiques d'hippocampes de souris ainsi que dans notre modèle de souris 3xTg-AD. En effet, nous avons mis au point une nouvelle technique dans le laboratoire pour étudier la maturation des épines dendritiques. Les coupes organotypiques d'hippocampes de souris ont

permis d'étudier l'impact de différents A β s synthétiques sur la maturation des épines dendritiques, reflétant indirectement les défauts de neurotransmission dans le cerveau. A l'aide de coupes infectées avec des lentivirus permettant l'expression de la β APP portant la mutation suédoise, nous avons pu aussi observer une action bénéfique d'un traitement au RB150 sur la maturation des épines dendritiques. Par la suite, nous avons conçu des shRNAs spécifiques pour APA afin d'étudier son implication dans la pathologie et comparer l'impact d'une invalidation soit précoce avec les shRNAs ou soit tardive avec le RB150. Comme on pouvait s'y attendre, l'invalidation précoce met en évidence des résultats nettes sur les aspects comportementaux et anatomiques. A l'inverse même si les résultats sont moins clairs, un traitement chronique (1 mois, par gavage ou par injection intra-péritonéal) avec le RB150 met en évidence la baisse de l'A β _{pE3-42} dans des souris âgées et améliore les performances cognitives.



La contribution d'Audrey Valverde dans ce projet : La mise au point de l'ensemble des expériences, la production lentivirale, les injections lentivirales par stéréotaxie, l'imagerie, les Elisas, le comportement, la préparation et l'analyse des coupes organotypiques et l'analyse des données.

En conclusion, cette étude présente pour la première fois les conséquences de la troncation du peptide A β dans sa région N-terminale par l'Aminopeptidase A dans un modèle intégré : les souris 3xTg-AD.

Aminopeptidase A contributes to biochemical, anatomical and cognitive defects in Alzheimer's disease mouse model and is increased in early stage sporadic Alzheimer's disease.

Audrey Valverde¹, Julie Dunys¹, Thomas Lorivel¹, Delphine Debayle¹, Anne-Sophie Gay¹, Sandra Lacas-Gervais², Bernard. P. Roques³, Mounia Chami¹ and Frédéric Checler^{1*}.

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, team labeled "Laboratory of Excellence (LABEX) Distalz", 660 route des Lucioles, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

² CCMA-Université Côte d'Azur, Nice, France.

³ Faculté de Pharmacie, Université Paris-Descartes, 75006 Paris

* To whom correspondence should be addressed: Dr. Frédéric Checler, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, 660 route des lucioles, 06560 Valbonne, France, Tel.: +33 4 93 95 34 60; Fax: +33 4 93 95 34 08; E-mail: checler@ipmc.cnrs.fr

Running Title: Aminopeptidase A contribution to Alzheimer's disease

Keywords: N-terminally-truncated A β , pE3-42A β , Aminopeptidase A, Inhibitors, shRNA, senile plaques, dendritic spines, behavior, transgenic mice

Abstract

One of the main components of early anatomical lesions in AD-affected brain is the cyclized A β species pE3-A β . The cyclisation of the glutamate residue in position 3 by glutaminyl cyclase requires prior removal of the A β N-terminal aspartyl residue to allow subsequent biotransformation. The enzyme responsible for this rate limiting catalytic step and its relevance as a putative trigger of Alzheimer's disease pathology remained yet unknown. Here we show by mass-spectrometry that purified aminopeptidase A (APA) truncates A β 40 to yield A β 2-40, a process fully blocked by the acidic protease inhibitor amastatin. We demonstrate that the pharmacological blockade of APA with RB150 restores the density of mature spines and drastically reduced filopodia in hippocampal organotypic slices expressing Swedish mutated APP. By combining pharmacological inhibition approach and APA gene reduction by shRNA, we show that APA lowering affects both A β 42 and pE3-42A β expressions and A β 42-positive plaques *in situ*, in 3xTg-AD mice brain. However, we establish by electron microscopy that reduction of APA does not significantly improve lysosomal pathology occurring early in 3xTg-AD mice brains. Further, we show that both APA inhibitors and shRNA partly alleviate learning deficits observed in 3xTg-AD mice. Finally, of most importance, we demonstrate that APA activity is augmented

concomitantly to the occurrence of A β pE3-42-positive plaques at early Braak stages in a cohort of sporadic AD brains. Overall, our data indicate that APA is a key enzyme involved in A β N-terminal truncation and suggest the potential benefit of targeting APA to interfere with AD pathology.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a devastating pathology that affects the aged population. At the histopathological level, AD is characterized by the accumulation of extracellular lesions, the senile plaques that are mainly composed of A β 40 and A β 42 peptides and of intracellular neurofibrillary tangles that result mostly from hyperphosphorylation of Tau [7, 16, 54]. These two lesions are not exhaustive and among others, neuroinflammatory stigmata, lysosomal/endosomal and mitochondrial dysfunctions as well as reticular stress perturbations have been consistently observed in AD-affected brains.

The etiology of AD is still an open question and consistent failure of A β -directed clinical assays raised the possibility that the so-called amyloid cascade that postulates amyloid- β (A β) as an etiological trigger of the pathology could well be erroneous [24]. However, genetic evidence clearly indicates that at least "something linked to APP" strongly participates to the pathological process. Thus, mutations responsible for early onset and aggressive forms of AD all affect either the A β -precursor protein (β APP) or the A β -generating enzyme (γ -secretase).

In order to reconcile indisputable genetic clues and recurrent failures of A β -directed clinical trials, one could envision additional APP-derived fragments distinct from A β , the contributions of which could have been underscored [37]. These include the β - and γ -secretases-derived APP C-terminal fragments C99 and C83, respectively [9], the recently described η -secretase generated fragments [3, 59] or AICD (APP Intracellular Domain) [34, 45]. In addition, several lines of evidence indicated that N-terminally truncated forms of A β correspond to the earliest and most abundant detectable A β species observed *post-mortem* in AD [51] as well as in down-syndrome-affected brains [25, 27]. This rather heterogeneous set of N-terminal fragments accumulates in the parenchyma as well as in cerebrovascular wall of endothelial cells [28, 35].

One of the most abundant and toxic forms of N-terminal truncated A β fragments is the pE3-42A β [17]. This fragment occurs early not only in compact but also diffuse

plaques [28, 29]. Its importance has been well established by means of genetic and pharmacological approaches targeting glutamyl cyclase (QC), the enzyme responsible for the cyclisation of glutamate in position three of A β [14, 53]. Thus, the depletion of the endogenous enzyme [32] or its pharmacological blockade by means of selective inhibitors [53] led to the abolishment of pE3-42A β production and significant improvement of cognitive functions in AD animal models. However, it should be emphasized that cyclisation of the E3 residues could only occur after prior removal of the two first N-terminal amino-acids of A β . Therefore, the enzymes involved in this first catalytic step could be seen as rate-limiting enzymes conditioning the production of pE3-42A β and therefore, govern its toxic phenotypes.

We previously showed that aminopeptidase A (APA) could well be responsible for the removal of the aspartyl residue in position 1 of A β [55]. This agreed well with theoretical grounds showing that APA has catalytic avidity and high affinity for acidic residues [8]. This was supported by a pharmacological approach showing that APA specific inhibitors potentiated the recovery of intact full-length A β in human embryonic kidney cells (HEK293) overexpressing the Swedish-mutated APP as well as in a cell free system of A β production [55]. However, the direct evidence of the generation of A β 2-X from A β was still lacking. Further, the putative anatomical, functional and cognitive consequences of APA-mediated cleavage of A β and thus, the contribution of APA to AD remained to establish. Here we demonstrate that APA contributes to the N-terminal truncation of A β and that its pharmacological blockade or gene reduction rescue biochemical, anatomical and behavioral defects observed in AD. Further, we show that concomitant to the appearance of pE3-A β 42, APA activity is augmented early in sporadic AD brains.

Materials and methods

Cell culture, transfections and FACS selection

Mouse neuroblastoma N2a cells (kindly provided by Dr Joëlle Chabry) were grown in DMEM-10%SVF-Penicillin/streptomycin medium, then transfected with Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer recommendation. Forty-eight hours after transfection, selection was performed by addition of puromycin and

maintained for three weeks. For fluorescence activated cells sorting (FACS), cells were scrapped with accutase (Sigma-Aldrich), centrifuged 5 min at 1000rpm, then pellet was resuspended in 500µl of PBS-BSA-EDTA buffer and filtered (0.45µm). The FACS platform employed the FACSAria III cell sorter (BD Biosciences) to recover Green Fluorescent Protein-positive cells (GFP-positive) and discarding of dead cells (using DAPI 0.05ug/ml and FSC/SSC parameter). Moreover, we performed doublet discrimination with SSC-H/SSC-A and FSC-H/FSC-A.

Organotypic slices preparation

Organotypic slices preparation was achieved on P5-P7 C57bl6JRj mice from Janvier Labs (Le Genest Saint-Isle, France). Brains were quickly dissected to retrieve hippocampi from both hemispheres and sliced onto 400µm sections and kept into slicing medium (Earles' Balanced Salt solution (EBSS; 97.5%) and EBSS-HEPES (2.5%)). Slices were plated into culture medium (Minimum Essential Medium Eagle (MEM)+ Gluthamax-1 (50%), EBSS (18%), EBSS/D-glucose 13% (5%), Penicillin-Streptomycin 5000U/ml (1%), Horse serum (25%) and Nystatin 10000U/ml (0.06%) and infected, 2 hours after plating, with lentiviruses coding for Green, APPwt and APPswe proteins respectively. Slices were kept at 37°C, 5% CO₂ for 9 days before imaging experiments.

Human brain samples and preparation for APA activity

Human brain samples were obtained thanks to the “NeuroCeb” Brain Bank run by a consortium of associations: CSC (Cerebellar ataxias), ARSEP (association for research on multiple sclerosis) and France Parkinson. All procedures performed with human brain samples were performed in accordance with the ethical standards of both institutional and national research committees as well as the 1964 Helsinki declaration and amendments. Individual consents were signed by the patients or their close relatives in their name and in accordance with the French Bioethical Agreement (AC-2013-1887). Cases were anonymized however all informations regarding age, sex and neuropathology are provided in Supplementary Table 1. Tissue lysates from human temporal cortex were obtained after mechanical homogenization of temporal cortex sections. Powder was then resuspended in Tris 10mM, homogenized by potter and sonicated. After determination of protein concentration with Bradford method [5], APA enzymatic activity was determined as described below.

Mass Spectrometry

Synthetic A β 40 from Bachem (15ng/ μ l) was incubated with recombinant human APA (2ng/ μ l) (R&D System) with or without APA inhibitor RB150 (100 μ M) for 8 hours in a final volume of 200 μ l of deionized water containing CaCl₂ (1mM). Samples were collected at different time (0, 2, 4, 6 and 8 hours). Reactions were stopped after addition of 0,1% of formic acid and samples were subjected to spectroscopic analysis. Briefly, A β peptides were then separated with Ultra Performance Liquid Chromatography system (UPLC) (ThermoFisher) on a C18 column in an appropriate gradient. Mass spectrometry data were acquired with a Q-Exactive *plus* mass spectrometer (ThermoFisher) operating in Full Scan mode. Finally, Beta-Amyloid fragments were identified using X calibur Quan-Browser software version 4.1.31.9.

Cytation Imaging

Cells were grown in 6-well plates at a density of 100 000 cells/well. Five days after infection, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA) for 20min, then washed three times with PBS, permeabilized with Triton 0.1% for 5min and blocked for one hour with 5% bovine serum albumin (BSA)/Tween 0.05%. Primary antibody against APA (Abcam) was added overnight at a 1/500 dilution. Cells were then rinsed three times with PBS then incubated for one hour with secondary anti-Goat antibody (Interchim, 1/500 dilution + Dapi 1/20 000 dilution). Cells were then rinsed again with phosphate buffer saline (PBS) 1X and fixed with the Vectamount medium (Vector Laboratories) before Cytation imaging. The Biotek Cytation 5 microscope automatically acquired 6 pictures per well with same acquisitions parameters (x20 magnification, numeric aperture 0.45, brightfield, at following excitation and emission wavelengths, respectively: DAPI (377; 447); GFP (469; 525); TxS Red (586; E 647)). We used a macro in image J software to quantify the fluorescence intensity TxSRed in GFP positive cells.

APA activity measurements

Hippocampi or FACS-selected cells were homogenized in Tris 10mM buffer. APA activity was measured on 50 μ g of homogenates in assay buffer Tris 50mM, pH 7.5 containing CaCl₂ (1mM) [55] with or without APA inhibitor, RB150 (100 μ M) using Glu-7-amino-4-methylcoumarin (Glu-7-AMC) substrate (100 μ M) (Santa Cruz Biotech).

Initial velocity recordings of fluorescence were performed at 360nm excitation and 460 nm emission wavelengths, as described [8].

Imaging of spine morphology and quantitation

Spine morphology imaging was assessed on ten to twenty pictures per condition on a LSM780 microscope (Zeiss, coord compagnie). Pictures were taken with Plan-Apochromat 63x/1.40 Oil DIC M27 lens, zoom 3.0 and pinhole at 52 μ m. Quantitation was performed manually using “false” colors images ZEN software with parameters as previously described [49, 50].

Viral production

Lentiviral particles were produced by cotransfecting two helper plasmids, delta8.9 (packaging vector) and VSV-G (envelope vector) and a transfer vector (pGFP-C-sh Lenti) into Lenti-X 293 T cell line (632180; Clontech, Mountain View, CA, USA) as previously described [11]. Viral titers were assessed using p24 ELISA (VPK-107; Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). Four shRNA constructs as well as a scramble control were inserted in the vector pGFP-C-sh Lenti (Cat. N°T R30023). Gene specific shRNA sequences are: TL513554 ENPEP (Gene ID 13809, Origen) Mouse shRNA.

Viral stereotaxic injections

Two to three-month-old wild-type and triple transgenic (3xTg-AD) mice were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and xylazine (10 mg/kg). Mice were placed in a mouse head holder, and lentiviral vectors were stereotactically injected bilaterally into the subiculum region (3 μ l) with viral particles (1×10^{10} to 2×10^{10} viral particles) at the following coordinates Sub: a/p: \pm 3.8, m/l \pm 2.5, d/v, -2.0 (The Mouse Brain in stereotaxic coordinates, Second Edition, Elsevier Academic Press).

***In vivo* pharmacological treatments**

A specific and potent inhibitor of APA, RB150 [19] was daily administered during six weeks by intraperitoneal injections at a dose of 15mg/kg (ie 0.3 mg/day for a 20g mouse) before animal sacrifices and analyses.

Immunohistochemistry

Mice were anesthetized by intraperitoneal injection of ketamine (120 mg/kg) and xylazine (24 mg/kg) and intracardially perfused with PBS followed by paraformaldehyde 4%. Brains were collected and embedded in paraffin then sliced (8 μ m of thickness) with a microtome apparatus. Slices were treated with formic acid and then incubated overnight at 4°C with primary antibodies (A β 42 (anti-beta amyloid 1-42 antibody, Abcam or anti pE3-xA β (N3pE antibody, IBL International)). After washes, sections were incubated for one hour with anti-rabbit horseradish peroxidase antibody (Interchim, Montluçon, France) or biotinylated anti-rabbit antibody (Vector laboratories, Burlingame, California, USA) for A β 42 and pE3-xA β , respectively. For pE3-xA β detection, signal amplification was achieved with the Vectastain Elite ABC-HRP kit. All slices were then revealed with the DAB-ImmPACT system (Vector Laboratories) as for A β 42 detection.

Insoluble fractions preparations and A β quantitation by Elisa

Human brain samples and dissected hippocampi from wild-type and 3xTgAD mice were homogenized in radioimmunoprecipitation assay buffer (RIPA) (Tris 50 mM; pH 7.4 containing NaCl (150 mM), ethylene diamine tetra acetic acid (1 mM), Triton X100 (1%), deoxycholate (0.5%), sodium dodecyl sulfate (SDS, 0,1%) and complete protease inhibitor mixture) as previously described [46]. After homogenization with a potter, proteins were centrifuged (100,000g, 1 hour, 4 °C), and supernatants were kept as soluble fractions (used for Western blot analyses). Pellets containing insoluble material were resuspended in formic acid (70%), centrifuged (100,000g, 1hour, 4 °C), and then supernatants were neutralized to pH 7.5 with Tris-HCl (1M, pH 10.8) containing betaine (25 mM) (at a 1/25 dilution) and considered as the insoluble fractions. For pE3-40/42A β detection, insoluble fractions were concentrated by speedvac at 40°C before neutralization with Tris-HCl (1M, pH 10.8) containing betaine (25 mM).

Human A β 40, A β 42 and pE3-xA β peptides levels were measured in the aforementioned soluble and insoluble fractions using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kits (BioSource [Invitrogen], France and IBL international, respectively) as described [36].

SDS/PAGE and Western Blot analyses

Membranous fractions were prepared from N2a cells. After centrifugation, cells were mechanically lysed in homogenate buffer (250mM sucrose, 1mM EDTA, 5mM HEPES), then centrifuged for 15min at 800g. Supernatants were collected and centrifuged for 1 hour at 20 000 g then pellets were resuspended in RIPA buffer with a protease inhibitor cocktail. Fifty micrograms of proteins (membranous or soluble fractions) were separated on Tris-glycine 10% acrylamide gels, then wet-transferred onto nitrocellulose. Membranes were incubated overnight with mitofusin 2 (MFN2; ab59889, mouse), β -actin (A5316-sigma, mouse), p62/Sequestosome-1 (NBP1-49956, Novus, Rabbit), Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain (LC3-NB100-2220,Novus,Rabbit), Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; MAB374-sigma, mouse) and APA (ab36122, goat) antibodies and revealed as previously described [22].

Animals

3xTgAD mice [44] and wild-type (WT; non-transgenic) mice were generated from breeding pairs provided by Dr. LaFerla (Irvine, USA). Animals were housed with a 12:12 h light/dark cycle and were given free access to food and water. All experimental procedures were in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and approved by the French Ministry of Higher Education and Research (Project number APAFIS#9645-2017012315473838) and by Cote d'Azur University Animal Care and Use Committee.

Barnes maze

Spatial learning and memory of mice were studied using a dry land-based rodent procedure [39]. First, mice performed three trials during four days on a spatial acquisition protocol allowing animals to retrieve a box placed under a hole of the Barnes Maze apparatus. Then mice were assessed for memory with a probe trial. Base was then removed and mice had a total time of 60 seconds to find the target place. Several parameters were evaluated: latency to reach the target site, number of quadrant crossing, latency and distance in the quadrant of the target site. Data were analyzed with the Animaze 6.1 Software.

Morris Water Maze

Morris Water Maze (MWM) task was assessed in a circular 90cm pool filled with a white opaque solution. Pool was placed in a room surrounded by visual clues. Maze was performed as previously extensively described [4, 11]. Data were analyzed with the Animaze 6.1 Software.

Rotarod Performance Test

Motor performance of mice was tested on a rotarod apparatus (Bioseb, model LE8200) as previously described [4]. Briefly, mice were placed on a rotating rod accelerating from 4 to 40 rpm. Latency to fall was then tested for all animals. Three trials were performed during a period of 5 minutes for each animal.

Open Field Test

Mice anxiety and exploratory behavior were recorded by an Open Field test. Briefly, time spend in the center of the box (40 x 40cm) was recorded during 10 minutes per animal.

Transmission Electron Microscopy (TEM)

Electron Microscopy was performed at the CCMA EM Core Facility (Université de Nice Sophia Antipolis). For TEM analysis, anesthetized mice were perfused transcardially with physiological serum to wash out the blood then with 2,5 % glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer. Brains were dissected, immersed into the fixative 24 hours before their vibratom cut in 400 μm sections. Subiculum were dissected to obtain a small cube of 1mm² x 400 μm . That were rinsed in 0.1M cacodylate buffer, and post-fixed for 2h in 1% osmium tetroxide and 1% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer. Samples were then rinsed in distilled water, dehydrated in acetone and embedded in epoxy resin. Contrasted ultrathin sections (70 nm) were analyzed under a JEOL 1400 transmission electron microscope mounted with a Morada Olympus CCD camera. We used ImageJ software to quantify lysosomal structures.

Statistical Analysis

Organotypic slices, electron microscopy and mass spectrometry were analyzed by One-way Anova, Kruskal-Wallis ($p \leq 0.05$; $p^{****} < 0.0001$) to study the spine

morphology difference between various synthetic A β (40,42 or pE3-42), or for slices infected with APP^{swe} or APP^{wt} then treated with RB150 (** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$), the lysosomal and mitochondrial dysfunctions (area, perimeter and class), the ratio A β_{2-40} /A β_{1-40} and for slices infected with APP^{swe} or APP^{wt} then treated with RB150 (** $p < 0.005$; **** $p < 0.0001$). Moreover, for quantification of electron microscopy, we excluded outliers with rout method (Q=1%). APA activities were compared by Wilcoxon ($p < 0.05$) and Mann-Whitney tests ($p < 0.05$). For behavior experiments on WT and 3xTg-AD mice injected with shRNA lentiviruses, all statistical analyses were realized using InVivoStat software. For each statistical analysis, normal distribution of residuals and homogeneity of variance were analyzed by checking normal probability plot and residual versus predicted plot. For Barnes Maze and MWM task, escape latency was analyzed by mixed model ANOVA with repeated measure (genotype x injection x training day) and followed by Benjamini-Hochberg's correction. Concerning statistics of Probe phase WM and Barnes Maze, openfield and Rotarod, the influences of both injection and genotype were considered by 2-way ANOVAs (genotype x injection) with multiple comparisons adjusted by Benjamini-Hochberg's method. For open field statistical analyses, data were log-10 transformed to respect homoscedasticity assumptions. For immunohistochemistry and ELISA, we used the Mann-Whitney test. The number, area and perimeter of plaques were analyzed by automatic program and every point corresponds to average between 6 and 15 pictures for each mouse.

Results

APA-mediated generation of A β 2-40 *in vitro*

We previously established that *in vitro*, the incubation of recombinant APA with synthetic A β reduced full-length A β recovery in an APA-inhibitor sensitive manner [55] but the exact nature of the cleavage mediated by APA was not established. According to A β sequence and APA specificity [8], it was expected that APA would trigger the removal of the N-terminal aspartyl residue. This theoretical assumption was verified by mass spectrometry analysis. Thus, we found that recombinant human APA (rhAPA) hydrolyses A β_{1-40} synthetic peptide that is converted into a smaller fragment identified as A β_{2-40} (**Figure 1A,B**). Of note, calculation of A β_{2-40} / A β_{1-40} ratios (**Figure 1C**) indicate that it increases transiently, suggesting that either recombinant APA contains a few contaminating exopeptidases or, alternatively, that APA itself could display a wide specificity explaining an atypical secondary cleavage of A β_{2-40} . However, we

show that A β 2-40 peptide formation was abolished in the presence of the acidic protease inhibitor amastatin known to act as a potent APA inhibitor (**Figure 1C,D**) [2]. This set of data confirms theoretical grounds suggesting that APP could display the ability to truncate A β at its N-terminus, thereby yielding A β 2-40.

APA-mediated alteration of synaptic maturation

We examined the functional consequences of targeting APA on synaptic plasticity. To address this question, we took advantage of hippocampal organotypic slices prepared from young mice (P5-P7) that were infected with lentiviruses expressing either wild-type APP (APPwt) or APP bearing the Swedish mutation (APPswe) to which was coupled the Green dye. Spine imaging allowed us to index morphological types of spines reflecting their various degree of maturity, *i.e* mature spines, stubby spines or filopodia (**Figure 2A**). Comparison of APPwt or APPswe organotypic slices revealed a reduction of mature spines concomitant to a drastic increase in the number of immature type spines (filopodia) in APPswe slices (**Figure 2B,C and Supplementary Figure 1**). Since the APPswe increases A β production [6, 12], this could indicate that either A β itself or one of its derived catabolites could alter synaptic plasticity in this mouse model. Of utmost interest, the increase of filopodia observed in APPswe slices was fully rescued by RB150, a specific and selective APA inhibitor [19] (**Figure 2B,C**), thus indicating that an APA-dependent catalysis accounted for synaptic maturation defects. This was verified on hippocampal slices derived from mice infected with a virus encoding a green fluorescent protein that were incubated with A β 40, A β 42 or pE3-42A β synthetic peptides (**Figure 3**). Interestingly, we observed that A β 40 had none effect on spine maturity while both A β 42 and pE3-42A β lowered the percentage of mature spines and concomitantly increased stubby and filopodia spines (**Figure 3A,B**). It should be noted that the extent of percentage of filopodia was higher in pE3-42A β than in A β 42 (**Figure 3B**). Altogether, these data indicated a cellular APA inhibitor-sensitive toxic effect on dendritic spines that can be mimicked by pE3-42A β peptide thereby suggesting that APA could alter synaptic morphology occurring in AD.

shRNA targeting APA influences pE3-42A β and A β plaques loads.

In order to examine the influence of endogenous APA on AD plaques, we first designed and validated APA-directed short hairpin ribonucleic acids (shRNA). Relevant shRNA should lower APA expression and activity in cells as well as *in vivo*. Four sequences were delineated *in silico* (**Supplementary Figure 2A**) and examined for their ability to down-regulate cellular expression and activity of APA. All constructs allow reduction of APA expression (**Supplementary Figure 2B,C**) and RB150-sensitive activity (**Supplementary Figure 2D**). We selected shRNA APA-A, which decreases APA expression and enzymatic activity by about 30% and 55%, respectively (**Supplementary Figure 2C,D**). Then lentiviruses harboring shRNA APA-A or their control shRNA scramble (thereafter referred to as shAPA or shScr) were designed, produced (titers were $1,38 \times 10^{10}$ and $1,71 \times 10^{10}$, respectively) and were shown to statistically significantly lower by about 20% APA expression in Neuro2a cells (**Figure 4 A,B**). For *in vivo* assessments, we chose to use the 3xTg-AD mice that recapitulate most of AD-related lesions [44] and have been used consistently as a relevant AD mouse model. Stereotaxic delivery in 3xg-AD mice brain subiculum (**Figure 4C**), a brain zone altered in AD [31], similarly reduced APA activity by about 20-30% as compared to shScr-infected mice.

We examined whether APA reduction could influence the density and morphology of plaques in 12 month-old 3xTg-AD mice brain. We observed a drastic reduction of the density of A β 42-positive plaques (**Figure 5 A,B and Supplementary Figure 3**) but not in the mean plaques perimeter or areas (**Supplementary Figure 4**). This was accompanied by a reduction of insoluble A β 42 (**Figure 5C**), an A β species thought to reflect its aggregated form seeded in plaques. We also examined the presence of pE3-A β -positive plaques and their susceptibility to APA gene reduction and pharmacological blockade. shAPA administration drastically reduces the density of pE3-42A β -positive plaques in 12 month-old 3xTg-AD mice when compared to shScr-infected mice (**Figure 6A**). Interestingly, both soluble (**Figure 6B**) and insoluble (**Figure 6C**) levels of pE3-42A β were highly enhanced in 15-month-old 3xTg-AD vs wild-type mice. Of importance, these augmentations were drastically reduced upon chronic treatment (daily administration for 6 weeks) with RB150 (**Figure 6B,C**). Overall, our data demonstrate that APA-mediated production of pE3-42A β directly influences both A β 42- and pE3-42A β -positive plaques and contents in 3xTg-AD mice.

shRNA targeting APA expression does not influence lysosomal dysfunction in 3xTg-AD mice.

Besides canonical anatomical lesions, AD brains have been shown to display lysosomal morphology alterations. Thus, we carried out electron microscopy to examine the putative influence of APA gene reduction on lysosomal (**Supplementary Figure 5**) morphology. Lysosomes and enlarged lysosomes (autolysosomes) (were referred to as category I and II, respectively as we previously described [38], the latter thought to reflect lysosomal perturbation. Our data indicate that the distribution of category I and II were not affected by shAPA administration (**Supplementary Figure 5B**). Further, the mean area of lysosomes of the category II was not significantly altered by shAPA (**Supplementary Figure 5C**). As autophagy is an intracellular degradation machinery directly linked to lysosomes [61], we checked for p62, LC3II (Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 II) and LC3I ratio that altogether allow monitoring the autophagic flux [33] as previously described [22, 23]. Our data indicate that although, as described [58], LC3I appeared to be enhanced in 3xTg-AD vs Wt mice, shAPA did not modulate LC3 expressions in 12 month-old 3xTg-AD mice brain (**Supplementary Figure 5D**). In addition, p62 was not affected by APA reduction (**Supplementary Figure 5D**). Overall, our data indicate that APA does not control lysosomal physiology but could contribute to mitochondrial homeostasis in 3xTg-AD mice.

Pharmacological blockade and gene reduction of APA alleviate learning and memory defects in 3xTg-AD mice.

The 3xTgAD mouse model not only recapitulates most of anatomical hallmarks observed in AD pathology but also display cognitive alterations in memory and learning tasks [56] that are characteristic defects observed in AD patients [30]. Two well-known spatial learning tests, the Morris Water Maze (MWM) and Barnes Maze were chosen as readout of learning tasks. Of note, the Barnes Maze was documented as the most sensitive test for detecting spatial memory defects as early as at 6,5 month-old in 3xTg-AD mice [57]. We first examined the influence of APA reduction seven months after shAPA stereotaxical administration in the subiculum of 3xTg-AD mice (see procedure timeline in **Figure 7A**). As expected, 3xTg-AD mice clearly performed less well than Wt mice for primary escape latency (**Figure 7B**), latency to reach the platform (**Figure 7C**), number of entries in the quadrant of the target (**Figure 7D**) and in the number of

entries in all holes of the Barnes Maze (**Figure 7E**). Interestingly, shAPA administration partly restored the primary escape latency (**Figure 7B**) and fully rescued the latency to the platform (**Figure 7C**). Similarly, although 3xTg-AD mice display a drastic lowering in the number of entries when compared to wt mice (**Figure 7D**, compare light and dark red bars), shAPA treatment fully abolished this alteration (**Figure 7D**, compare blue bars). Our data also indicate that shAPA modified the distribution of the number of entries in 3xTg-AD mice, illustrated by a less randomness and more focused distribution of entries in the adequate hole (**Figure 7E**) and a modification of entries in different quadrants (**Supplementary Figure 8A,B**). Of importance, although we observed a better motor coordination in 3xTg-AD mice than in WT mice as was previously established [21], the above-described shAPA-related behavioral modifications were not due to shAPA-linked alterations of motricity (**Supplementary Figure 8A**), anxiety (**Supplementary Figure 8B**) or visual acuity (**Supplementary Figure 8C**) as verified using rotarod, open field tests and visual cued test, respectively.

In order to strengthen our data on the influence of APA gene reduction *in vivo*, we aimed at assessing the contribution of APA on learning deficits via pharmacological treatment of 3xTg-AD mice with RB150. The behavioral paradigms monitored after chronic treatment (daily treatment during 6 weeks) with this APA inhibitor were similar to those described above for *in vivo* shAPA experiments (see time frame in **Figure 8A**). As a whole, RB150 and shRNA outcomes were closely similar. Thus RB150: i) partly restored the primary escape latency (**Figure 8B**); ii) partly rescued the latency to the platform (**Figure 8C**); iii) fully abolished the lowering in the number of entries observed in 3xTg-AD mice (**Figure 8D**) and iv) lowered the randomness of entries in the adequate hole (**Figure 8E**) without affecting motricity (**Supplementary Figure 9A**), anxiety (**Supplementary Figure 9B**) and vision (**Supplementary Figure 9C**). Overall, our data indicate that pharmacological reduction and gene reduction of APA both partly alleviate learning and spatial memory defects observed in the 3xTg-AD mice model

APA activity is increased early and transiently in brains of sporadic AD patients.

It has been reported that various N-terminally truncated species, and more particularly pE3-42A β , could be recovered in abundance in brains and cerebrospinal fluid of both sporadic and familial AD patients [18, 48]. As we demonstrate here that APA catalyzes the removal of the first aspartyl residue of A β , and thus trigger the first catalytic step of N-terminal truncation subsequently leading to pE3-42A β , we postulate

that AD-related accumulation of pE3-42A β could be accounted for by an increased activity of APA. Thus, we examined the status of pE3-42A β -positive plaques and pE3-42A β content in the hippocampus and temporal lobe of sporadic AD brains at various Braak stages (Table 1) and the same cohort was used to monitor RB150-sensitive APA activity. We show that, as previously reported [20], AD-affected brains exhibit a high density of pE3-42A β -positive plaques that appeared at stage II and increased significantly according to Braak stage while control brains reveal little if any pE3-42A β -like immunoreactivity (**Figure 9A**). Accordingly, both pE3-40A β (**Figure 9B**) and pE3-42A β (**Figure 9C**) increased with pathological stage. Of utmost interest, kinetic analyses demonstrated that RB150-sensitive APA activity was higher at early AD stage (I-III) and then returned to values identical to those of samples of other AD stages. Of interest, this transient augmentation of APA appeared concomitant to the occurrence of pE3-42A β -containing plaques and biochemical detection of pE3-42A β . These observations are consistent with the hypothesis of an early APA-mediated production of pE3-42A β that would serve as seed to propagate anatomical lesions and pE3-42A β accumulation without need for a sustained increase in APA activity.

Discussion

Alzheimer's disease-affected brains are invaded by senile plaques and neurofibrillary tangles, the main components of which consist in a set of hydrophobic peptides (A β peptides) that accumulate extracellularly and an hyperphosphorylated form of a microtubule-associated protein named Tau that occurs intracellularly in neurons [16, 47]. Senile plaques are preceded by diffuse plaques. The amorphous or fibrous nature of these pre-amyloid lesions is still discussed [15]. Besides these canonical lesions, early additional dysfunctions have been described that include mitochondrial structure and function alterations, lysosomal/ endosomal defects and neuroinflammatory stigmata. Although a bulk of works has been centered on the participation of A β and Tau to these anatomical hallmarks, recent studies have indicated that additional APP- or A β -related products could well contribute to AD pathology. Thus, histochemical, immunological and biochemical analyses consistently established the occurrence of pE3-A β 40/42 as the main component of compact plaques [51] but also diffuse [29] and vascular amyloid deposits [35]. Thus, pE3-A β 40/42 could well contribute significantly to AD pathology.

The above observation and thus, the potential key role of pE3-A β 40/42 in AD explained the search for the protease responsible for the cyclization of the glutamate residue at position 3 of the N-terminal moiety of A β . Concordant anatomical, pharmacological, and genetic evidences indicated that the enzyme responsible for pE3-X A β cyclization could be ascribed to glutaminy cyclase (QC) [14, 52, 53]. Thus, QC depletion [32] or pharmacological blockade [53] both rescue behavioral defects in transgenic animals. Supporting the importance of QC in AD, it was established that QC protein and mRNA expressions colocalized with pE3-40/42 A β in AD-affected brain areas and correlates better than A β with cognitive alterations [42]. This set of data strongly supported the view that QC-mediated generation could be a key event in the neurodegenerative process taking place in AD.

Prior to cyclization yielding pE3-A β 40/42, A β must undergo a N-terminal truncation that removes its first aspartyl residue. Preventing this rate-limiting catalysis should be seen as a potentially protective event. The acidic nature of aspartyl and the fact that it occurs as a free residue suggested that this cleavage could be triggered by an exopeptidase with high affinity for acidic amino-acids. APA fulfils these criteria. Indeed, we previously established that APA inhibitors increased the recovery of full-length A β in various cell lines and that this protected cells from staurosporine-induced apoptosis [55]. However, the direct cleavage of A β by APA, its potential influence on various AD-related stigmata and its relevance in *in vivo* models remained to be established.

Our study brings four lines of independent evidences showing the role of APA in pE3-A β 40/42 generation and the anatomical and functional benefits of the down-regulation of its activity. First, mass-spectroscopy analysis established the conversion of A β 1-40 into A β 2-40. Second, pharmacological blockade of APA restored a normal dendrites morphology distribution in Swe-APP-infected hippocampal organotypic slices. Third, APA inhibitors and shRNA both drastically reduces A β 42- and pE3-A β 40/42-positive plaques. Fourth, pharmacological and genetic reductions of APA activity alleviate learning and memory defects displayed by 3xTg-AD mice. It is interesting to note that in agreement with our observations, Clark and Colleagues reported on a coincidence of synaptic plasticity alterations and spatial working memory in 3xTg-AD mice [13].

Lysosomal/endosomal perturbations [40] have been reported to occur early in AD-affected brains. We have shown that lysosomal defects occur very early in 3xTg-AD mice, at a stage where A β content and plaques are not detectable. We and others showed that in various AD models, these alterations could be ascribed to the β -secretase-derived APP C-terminal fragment (C99), rescued by β -secretase inhibitors and exacerbated by γ -secretase blockers [10, 37, 38]. We show that APA reduction did not influence lysosomal perturbation observed in 3xTg-AD mice. Thus, the absence of effect of APA modulation concomitant to the lack of pE3-A β confirms that very early deficits observed in AD could be independent of A β and therefore of its catabolite pE3-A β .

Learning and memory defects that occur later in 3xTg-AD mice were partly alleviated by APA pharmacological blockade and genetic down-regulation. This agrees perfectly with our previous conclusions brought by the comparison of 3xTg-AD and 2xTg-AD mice. Thus, both mice accumulate C99 similarly but 3xTg-AD only show plaques and A β -accumulation at late stage [4]. Interestingly, both mouse models exhibit similar apathy-like phenotype and LTP alterations while 3xTg-AD mice show higher memory deficits than 2xTg-AD mice [4]. This indicated that besides C99, A β or an A β -related catabolite could contribute to late stage memory defects. Our study strongly suggests that pE3-A β and APA-mediated catalytic initiation of A β truncation could well account for the increment of memory and learning deficits in 3xTg-AD mice. The fact that APA modulation did not fully rescue some of the behavioral defects could be due to the fact that C99 itself contributes to these deficits, to the fact that shRNA and RB150 did not completely abolish APA activity, or both.

Another interesting aspect of our study is the observation that partial reduction of APA was sufficient to drastically reduce both A β 42- and pE3-42A β -positive plaques and contents in insoluble fractions thought to reflect an aggregated state of peptides. This agrees well with previous studies showing that pE3-A β 42 aggregates early in AD transgenic models [41] and display a prion-like behavior [43]. Further, it was documented that very low amounts of pE3-42A β could serve as a seed of A β 42 aggregation and deposition [60] and that small quantities of pE3-42A β are sufficient to trigger selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice [1]. Thus, partial reduction of pE3-42A β by APA modulation could likely explain both the lowering of

A β 42-positive plaques and content and improvement of pE3-42A β -mediated behavioral alterations occurring concomitantly at same ages.

If APA is assumed to contribute to Alzheimer's disease, its expression may be increased in affected brains as has been previously shown for several endo- and exopeptidases [26]. Our study shows that pE3-42A β -positive plaques occur at Braak stage II in sporadic AD-affected brains, when pE3-42A β protein begins to be detectable. Interestingly, at this stage, APA activity was higher in AD than in control brains. This increase appeared to be transient, suggesting that APA increase could initiate a pathogenic process reflected by pE3-42A β -positive plaques and increased recovery.

Overall, our study brings novel biochemical, anatomical and behavioral insights on the involvement of APA in the first step of A β catalysis ultimately leading to pE3-42A β . This production could account to the cognitive alterations generally ascribed to full-length A β . It should be noted that A β itself derives from the proteolysis of its precursor C99 that harbors many characteristics of an etiological trigger [10, 37]. It remains that interfering with APA could be seen as a mean to alleviate, at least partly, some of the AD-related mnemonic deficits. In this context, it should be noted that RB150 crosses the blood brain barrier after its peripheral administration, inhibits brain APA and has been successfully used to circumscribe hypertension in animals. Thus, we propose that the potential of APA inhibitors in AD should be examined.

Footnotes

We wish to thank Dr. La Ferla for his initial supply of 3xTg-AD mice. This work was supported through the LABEX (excellence laboratory, program 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. The authors greatly thank Frédéric Brau, Sophie Abelanet and Julie Cazareth at Imaging and Cytometry platform (Côte d'Azur, MICA) The authors thank Dr Luc Buée (UMR 837 Inserm-UDSL-CHRU, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Lille).

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

References

- 1 Alexandru A, Jagla W, Graubner S, Becker A, Bauscher C, Kohlmann S, Sedlmeier R, Raber KA, Cynis H, Ronicke Ret al (2011) Selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice expressing small amounts of truncated Abeta is induced by pyroglutamate-Abeta formation. *J Neurosci* 31: 12790-12801 Doi 10.1523/JNEUROSCI.1794-11.2011
- 2 Aoyagi T, Tobe H, Kojima F, Hamada M, Takeuchi T, Umezawa H (1978) Amastatin, an inhibitor of aminopeptidase A, produced by actinomycetes. *The Journal of antibiotics* 31: 636-638 Doi 10.7164/antibiotics.31.636
- 3 Baranger K, Marchalant Y, Bonnet AE, Crouzin N, Carrete A, Paumier JM, Py NA, Bernard A, Bauer C, Charrat E et al (2015) MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci*: Doi 10.1007/s00018-015-1992-1
- 4 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 Doi 10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.038
- 5 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248-259
- 6 Cai X-D, Golde TE, Younkin SG (1993) Release of excess amyloid b protein from a mutant amyloid b protein precursor. *Science* 259: 514-516
- 7 Calderon-Garciduenas AL, Duyckaerts C (2017) Alzheimer disease. *Handbook of clinical neurology* 145: 325-337 Doi 10.1016/B978-0-12-802395-2.00023-7
- 8 Checler F (1993) Neuropeptide-degrading peptidases. In: Nagatsu T, Parvez H, Naoi M, Parvez S (eds) *Methods in neurotransmitters and neuropeptides research Part 2*. Elsevier Science Publishers, City, pp 375-418
- 9 Checler F (1995) Processing of the b-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 65: 1431-1444
- 10 Checler F, Afram E, Pardossi-Piquard R, Lauritzen I (2020) Is g-secretase a beneficial inactivating enzyme of the toxic APP C-terminal fragment C99? *J Biol Chem* Submitted for publication:
- 11 Cisse M, Duplan E, Lorivel T, Dunys J, Bauer C, Meckler X, Gerakis Y, Lauritzen I, Checler F (2017) The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model. *Mol Psychiatry* 22: 1562-1575 Doi 10.1038/mp.2016.152
- 12 Citron M, Oltersdorf T, Haass C, McConlogue L, Hung AY, Seubert P, Vigo-Pelfrey C, Lieberburg I, Selkoe DJ (1992) Mutation of the b-amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases b-protein production. *Nature* 360: 672-674
- 13 Clark JK, Furgerson M, Crystal JD, Fechheimer M, Furukawa R, Wagner JJ (2015) Alterations in synaptic plasticity coincide with deficits in spatial working memory in presymptomatic 3xTg-AD mice. *Neurobiol Learn Mem* 125: 152-162 Doi 10.1016/j.nlm.2015.09.003
- 14 Cynis H, Scheel E, Saido TC, Schilling S, Demuth HU (2008) Amyloidogenic Processing of Amyloid Precursor Protein: Evidence of a Pivotal Role of Glutaminyl Cyclase in Generation of Pyroglutamate-Modified Amyloid-beta. *Biochemistry*:
- 15 Davies CA, Mann DM (1993) Is the "preamyloid" of diffuse plaques in Alzheimer's disease really nonfibrillar? *Am J Pathol* 143: 1594-1605
- 16 DeTure MA, Dickson DW (2019) The neuropathological diagnosis of Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 14: 32 Doi 10.1186/s13024-019-0333-5

- 17 Dunys J, Kawarai T, Sevalle J, Dolcini V, St George-Hyslop P, Alves da Costa C, Checler F (2007) p53-dependent Aph-1 and Pen-2 anti-apoptotic phenotype requires the integrity of the gamma -secretase complex but is independent of its activity. *J Biol Chem* 282: 10516-10525
- 18 Dunys J, Valverde A, Checler F (2018) Are N- and C-terminally truncated Abeta species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *J Biol Chem* 293: 15419-15428 Doi 10.1074/jbc.R118.003999
- 19 Fournié-Zaluski M-C, Fassot C, Valentin B, djordjijevic D, Reaux le Goaziogo A, Corvol P, Roques B-P, Llorens-Cortes C (2004) Brain renin angiotensin system blockade by systemically active aminopeptidase A inhibitors: a potential treatment of salt-dependent hypertension. *ProcNatlAcadSci* 101: 7775-7780
- 20 Frost JL, Le KX, Cynis H, Ekpo E, Kleinschmidt M, Palmour RM, Ervin FR, Snigdha S, Cotman CW, Saido TC et al (2013) Pyroglutamate-3 amyloid-beta deposition in the brains of humans, non-human primates, canines, and Alzheimer disease-like transgenic mouse models. *Am J Pathol* 183: 369-381 Doi S0002-9440(13)00353-2 [pii] 10.1016/j.ajpath.2013.05.005
- 21 Garvock-de Montbrun T, Fertan E, Stover K, Brown RE (2019) Motor deficits in 16-month-old male and female 3xTg-AD mice. *Behav Brain Res* 356: 305-313 Doi 10.1016/j.bbr.2018.09.006
- 22 Goiran T, Duplan E, Chami M, Bourgeois A, El Manaa W, Rouland L, Dunys J, Lauritzen I, You H, Stambolic Vet al (2018) beta-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. *Biol Psychiatry* 83: 416-427 Doi 10.1016/j.biopsych.2017.04.011
- 23 Goiran T, Duplan E, Rouland L, El Manaa W, Lauritzen I, Dunys J, You H, Checler F, Alves da Costa C (2018) Nuclear p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional down-regulation. *Cell Death Differ* 25: 873-884 Doi 10.1038/s41418-017-0016-0
- 24 Herrup K (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* 18: 794-799 Doi 10.1038/nn.4017
- 25 Hosoda R, Saido TC, Otvos L, Jr., Arai T, Mann DM, Lee VM, Trojanowski JQ, Iwatsubo T (1998) Quantification of modified amyloid beta peptides in Alzheimer disease and Down syndrome brains. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 1089-1095 Doi 10.1097/00005072-199811000-00012
- 26 Ichai C, Chevallier N, Delaere P, Dournaud P, Epelbaum J, Hauw JJ, Vincent JP, Checler F (1994) Influence of region-specific alterations of neuropeptidases content on the catabolic fates of neuropeptides in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 62: 645-655
- 27 Iwatsubo T, Mann DMA, Odaka A, Suzuki N, Ihara Y (1995) Amyloid b protein (Ab) deposition: Ab42(43) precedes Ab40 in down syndrome. *Annals of Neurol* 37: 294-299
- 28 Iwatsubo T, Odaka A, Suzuki N, Mizusawa H, Nukina N, Ihara Y (1994) Visualization of Ab42(43) and Ab40 in senile plaques with end-specific Ab monoclonals: evidence that an initially deposited species is Ab42(43). *Neuron* 13: 45-53
- 29 Iwatsubo T, Saido TC, Mann DM, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (1996) Full-length amyloid-b(1-42(43)) and amino-terminally modified and truncated amyloid-b42(43) deposit in diffuse plaques. *Am J Pathol* 149: 1823-1830
- 30 Jahn H (2013) Memory loss in Alzheimer's disease. *Dialogues Clin Neurosci* 15: 445-454
- 31 Jaroudi W, Garami J, Garrido S, Hornberger M, Keri S, Moustafa AA (2017) Factors underlying cognitive decline in old age and Alzheimer's disease: the role of the hippocampus. *Rev Neurosci* 28: 705-714 Doi 10.1515/revneuro-2016-0086
- 32 Jawhar S, Wirths O, Schilling S, Graubner S, Demuth HU, Bayer TA (2011) Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A{beta} formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *J Biol Chem* 286: 4454-4460 Doi 10.1074/jbc.M110.185819

- 33 Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli Ket al (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* 12: 1-222 Doi 10.1080/15548627.2015.1100356
- 34 Konietzko U (2012) AICD nuclear signaling and its possible contribution to Alzheimer's disease. *Curr Alzheimer Res* 9: 200-216 Doi BSP/CAR /0189 [pii]
- 35 Kuo Y-M, Emmerling M, Woods AS, Cotter RJ, Roher AE (1997) Isolation, chemical characterization, and quantitation of A beta 3-pyroglutamyl peptide from neuritic plaques and vascular amyloid deposits. *Biochem Biophys Res Commun* 237: 188-191
- 36 Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, Fraser P, St-George-Hyslop P, Le Thuc O, Espin Vet al (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: 16243-11655a Doi 10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012
- 37 Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Becot A, Checler F (2019) Does Intraneuronal Accumulation of Carboxyl-terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease? *Curr Alzheimer Res* 16: 453-457 Doi 10.2174/1567205016666190325092841
- 38 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 Doi 10.1007/s00401-016-1577-6
- 39 Lena I, Mantegazza M (2019) NaV1.2 haploinsufficiency in Scn2a knock-out mice causes an autistic-like phenotype attenuated with age. *Sci Rep* 9: 12886 Doi 10.1038/s41598-019-49392-7
- 40 Malik BR, Maddison DC, Smith GA, Peters OM (2019) Autophagic and endo-lysosomal dysfunction in neurodegenerative disease. *Molecular brain* 12: 100 Doi 10.1186/s13041-019-0504-x
- 41 Mandler M, Rockenstein E, Ubhi K, Hansen L, Adame A, Michael S, Galasko D, Santic R, Mattner F, Masliah E (2012) Detection of peri-synaptic amyloid-beta pyroglutamate aggregates in early stages of Alzheimer's disease and in AbetaPP transgenic mice using a novel monoclonal antibody. *J Alzheimers Dis* 28: 783-794 Doi W322521238342512 [pii] 10.3233/JAD-2011-111208
- 42 Morawski M, Schilling S, Kreuzberger M, Waniek A, Jager C, Koch B, Cynis H, Kehlen A, Arendt T, Hartlage-Rubsamen Met al (2014) Glutaminyl cyclase in human cortex: correlation with (pGlu)-amyloid-beta load and cognitive decline in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 39: 385-400 Doi 10.3233/JAD-131535
- 43 Nussbaum JM, Schilling S, Cynis H, Silva A, Swanson E, Wangsanut T, Tayler K, Wiltgen B, Hatami A, Ronicke Ret al (2012) Prion-like behaviour and tau-dependent cytotoxicity of pyroglutamylated amyloid-beta. *Nature* 485: 651-655 Doi nature11060 [pii] 10.1038/nature11060
- 44 Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy G, Golde TE, Kaye R, Metherate R, Mattson MP, Akbari Y, LaFerla F (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Ab and synaptic dysfunction. *Neuron* 39: 409-421
- 45 Pardossi-Piquard R, Checler F (2012) The physiology of the beta-amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *J Neurochem* 120 (Suppl. 1): 109-124 Doi 10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x
- 46 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

- 47 Perl DP (2010) Neuropathology of Alzheimer's disease. *Mt Sinai J Med* 77: 32-42 Doi 10.1002/msj.20157
- 48 Portelius E, Andreasson U, Ringman JM, Buerger K, Daborg J, Buchhave P, Hansson O, Harmsen A, Gustavsson MK, Hanse E et al (2010) Distinct cerebrospinal fluid amyloid beta peptide signatures in sporadic and PSEN1 A431E-associated familial Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* 5: 2
- 49 Qiao H, Li MX, Xu C, Chen HB, An SC, Ma XM (2016) Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast* 2016: 8056370 Doi 10.1155/2016/8056370
- 50 Risher WC, Patel S, Kim IH, Uezu A, Bhagat S, Wilton DK, Pilaz LJ, Singh Alvarado J, Calhan OY, Silver D et al (2014) Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines. *Elife* 3: Doi 10.7554/eLife.04047
- 51 Saido TC, Iwatsubo T, Mann DMA, Shimada H, Ihara Y, Kawashima S (1995) Dominant and differential deposition of distinct b-amyloid peptide species, Ab_{N3} in senile plaques. *Neuron* 14: 457-466
- 52 Schilling S, Appl T, Hoffmann T, Cynis H, Schulz K, Jagla W, Friedrich D, Wermann M, Buchholz M, Heiser U et al (2008) Inhibition of glutaminyl cyclase prevents pGlu-Aβ formation after intracortical/hippocampal microinjection in vivo/in situ. *J Neurochem* 106: 1225-1236 Doi 10.1111/j.1471-4159.2008.05471.x
- 53 Schilling S, Zeitschel U, Hoffmann T, Heiser U, Francke M, Kehlen A, Holzer M, Hutter-Paier B, Prokesch M, Windisch M et al (2008) Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Aβ and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* 14: 1106-1111
- 54 Sengoku R (2020) Aging and Alzheimer's disease pathology. *Neuropathology* 40: 22-29 Doi 10.1111/neup.12626
- 55 Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournie-Zaluski MC, Roques B, Checler F (2009) Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem* 109: 248-256
- 56 Stevens LM, Brown RE (2015) Reference and working memory deficits in the 3xTg-AD mouse between 2 and 15-months of age: a cross-sectional study. *Behav Brain Res* 278: 496-505 Doi 10.1016/j.bbr.2014.10.033
- 57 Stover KR, Campbell MA, Van Winssen CM, Brown RE (2015) Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 289: 29-38 Doi 10.1016/j.bbr.2015.04.012
- 58 Vaillant-Beuchot L, Mary A, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Lauritzen I, Eysert F, Kinoshita PF, Cazareth J, Badot C, Fragaki K et al (2020) Amyloid precursor protein C-terminal fragments accumulation triggers mitochondrial structure, function and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains. *Acta Neuropathologica* In press:
- 59 Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovsepian SV, Chafai M, Kootar S, Hornburg D, Evans LD, Moore S, Daria A et al (2015) γ-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 526: 443-447 Doi 10.1038/nature14864
- 60 Wittnam JL, Portelius E, Zetterberg H, Gustavsson MK, Schilling S, Koch B, Demuth HU, Blennow K, Wirths O, Bayer TA (2012) Pyroglutamate amyloid beta (Aβ) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem* 287: 8154-8162 Doi 10.1074/jbc.M111.308601
- 61 Yim WW, Mizushima N (2020) Lysosome biology in autophagy. *Cell Discov* 6: 6 Doi 10.1038/s41421-020-0141-7

Legends of figures

Fig. 1 APA catalyzes the production of A β 2-40 from A β 40. Representation of HPLC chromatograms of A β 1-40 (**A**) and A β 2-40 (**B**) peptides with their spectrum and their spectral deconvolution revealing m/z values (4327.1515 and 4212.1261 respectively). **C**: A β 2-40/A β 1-40 ratio is represented over time in presence or absence of rhAPA, with or without amastatin. In **D** quantitation of A β 2-40/A β 1-40 ratio at 4 hours incubation in conditions identical to those in panel C. Statistical analysis was performed using one-way ANOVA with Dunn's multiple comparisons post-test (* p<0.05).

Fig.2. Pharmacological blockade of APA influences synaptic plasticity. **A**) typical organotypic illustrations of slices infected with Green lentivirus as described in the methods. Red boxes highlight mature spines, yellow box shows stubby spines and green box shows filopodia. **B**: Dendrites morphology in organotypic slices infected with lentivirus expressing either APPwt or APPswe and treated or not with RB150. In **C**, organotypic slices were transduced with either APPwt or APPswe lentiviruses, then treated or not with RB150 and quantitated. Statistical analyses were performed using Kruskal-Wallis with Dunn's multiple comparisons post-test (APPWT NT: n=11; APPWT RB150: n=7; APPSwe NT: n=22; APPSwe RB150: n=27, * p<0.05; ** p<0.005; ***p<0.0005; ****p<0.0001). ns, not statistically significant.

Fig.3. pE3-42A β influences dendritic spines morphology. **A**, slices were infected with Green expressing lentivirus then exposed to synthetic A β 40, A β 42 or pE3-42A β . Then spines were quantitated (**B**). Statistical analyses were performed using a One-way Anova, Kruskal-Wallis test (Green NT: n=20; Green A β 40: n=12; Green A β 42: n=10; Green pE3-42A β : n=28. * p<0.05; ** p<0.005; ***p<0.0005; ****p<0.0001)

Fig.4. shRNA dependent modulation of endogenous APA in N2a cells and in infected mouse brain. **A**: Cytation imaging of N2a cells transduced with lentiviruses encoding either shRNA targeting APA (shAPA) or scramble shRNA (shscr). Images are representatives of immunofluorescences for APA, GFP (shRNAs) and Dapi stainings. **B**: Graph represents quantitation of APA positive N2a cells visualized using cytation imaging. N=520 for shScr and N=539 for shAPA; *p< 0.05 (Mann Whitney statistical test). **C**: Pictures of mouse brain slices showing shRNA distribution (GFP-

positive cells) one month after stereotaxic injection. **D** and **E**: APA enzymatic activity was fluorimetrically measured in hippocampi of infected mice as described in the methods (n=9, statistical analysis: Wilcoxon test in **D** and Mann-Whitney in **E**; *p<0.05).

Fig.5. A β 42 plaques are decreased in 3xTgAD mice brain after genetic down-regulation of endogenous APA. **A**: Immunohistochemical analysis of A β 42 in twelve months-old 3xTgAD transgenic mice previously injected with shScr or shAPA. Scale bars = 100 μ m or 500 μ m where indicated. **B**. Graph represents numbers of A β 42 positive plaques per squared mm. Data are represented as means +/- SEM, (for shScr; n=5; means of 3 to 10 pictures per mouse and for shAPA: n=8; means of 3 to 6 pictures per mouse). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test. A β 42 levels are detected by ELISA in insoluble fractions (**C**) prepared from twelve month-old 3xTgAD transgenic mice injected with shAPA (n=16) or shScr (n=14). Data are expressed in pg of A β 42 per mg of tissue.

Fig.6. Genetic and pharmacological modulations of APA reduce pE3-xA β containing plaques and pE3-42A β expression in 3xTg-AD brains. **A**: Immunohistochemical analysis of pE3-xA β in twelve month-old 3xTgAD transgenic mice previously injected with a shScr or shAPA. **B** and **C** represent pE3-42A β levels in soluble (**B**) and insoluble (**C**) fractions prepared from hippocampi of fifteen month-old WT or 3xTgAD mice treated daily 6 weeks by oral gavage with serum (CT) or RB150 compound (WT: n=4; WT+RB150: n= 5; 3xTgAD: n=5; 3xTgAD + RB150: n=5). Statistical analysis was performed using Mann-Whitney test between 3xTgAD with serum or RB150 (*p value <0.05).

Fig.7. Genetic down-regulation of APA restores learning and memory in 3xTgAD mice model. **A**, Time schedule of analyses mice infected with shRNA coding lentiviruses. **B,C** graphs represent the latency to find the target hole in Barnes maze (**B**) and the latency to reach the platform in Morris Water Maze (**C**) for WT and 3xTgAD mice infected with shAPA or shScr). **D,E** show the number of entries in target quadrant of the MWM (**D**) and number of entries in every hole of the Barnes maze (**E**). Statistical analyses were performed using InVivoStat (WT shRNA scramble: n=11; WT shRNA APA: n=11; 3xTgAD shScr: n=9; 3xTgAD shAPA: n=12) by 2-way ANOVAs. Repeated measures parametric analysis: genotype x shRNA x day: p<0.05 for WMW and p<0.05

for Barnes Maze, post-hoc comparisons: * $p < 0.05$, ** $p > 0.005$. Probe test: genotype x shRNA, $p < 0.05$, post-hoc comparisons: ** $p < 0.005$. Genotype difference between 3xTgAD and WT for hole numbers: $p < 0.005$). ns, not statistically significant.

Fig.8. Pharmacological inhibition of APA restores learning and memory in 3xTgAD mice model. **A:** Time schedule of analyses mice treated daily with either physiological serum or RB150. **B,C** graphs represent the latency to find the target hole in Barnes maze (**B**) and the latency to reach the platform in Morris Water Maze (**C**) for WT and 3xTgAD mice treated (light blue and dark blue respectively) or not treated (light red and dark red, respectively) with RB150. **D,E** show number of entries in target quadrant of the MWM, and of entries in every hole of the Barnes. Statistical analyses were performed using Anova test (WT serum: $n = 10$; WT RB150: $n = 10$; 3xTgAD serum: $n = 8$; 3xTgAD RB150: $n = 8$). Statistical analyses were performed using 2-way ANOVAs test (genotype difference between 3xTgAD and WT: $p < 0.0001$ for WMW and Barnes Maze and for hole numbers: ** $p < 0.001$). ns, not statistically significant.

Fig.9. APA enzymatic activity and pE3-xA β expression in human brain samples. **A:** Immunohistochemical analysis of pE3-xA β expression in hippocampi of control and AD-affected brains at indicated Braak stages (Scale bar, 100 μ m). pE3-40A β (**B**) and pE3-42A β (**C**) peptides were measured by ELISA (controls: $n = 10$; AD I-III: $n = 4$; AD IV-V, $n = 5$; AD VI: $n = 9$; statistical analysis: Kruskal-Wallis, ** p value < 0.005). In **D:** APA enzymatic activity was measured by fluorimetry as described in the indicated AD-affected samples (controls: $n = 10$; AD I-III: $n = 4$; AD IV-V, $n = 5$; AD VI: $n = 9$; using two-way Anova with Dunnett's multiple comparisons post-test). * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$.

Supplementary Figures:

Supplementary Figure 1: Pictures shows dendrites from organotypic slices infected either with lentiviruses expressing APPwt or APPswe and analyzed as described in Figures 2 and 3, respectively.

Supplementary Figure 2: Table in **A** presents several shRNA sequences tested for APA inactivation, as well as a scramble sequence. **B**, represents APA immunoreactivity after cell transfection with the scramble or the four shRNA constructs

targeting APA. GAPDH immunoreactivity was used as a loading control and recombinant APA (rhAPA) was loaded and served as a positive control for APA detection. In **C**, graph represents quantitation of APA expression after transfection of several shRNA constructs and expressed in percent of control three independent experiments; shRNA scramble: n=6; shRNA APA-A: n=7; shRNA APA-B: n=7; shRNA APA-C: n=6; shRNA APA-D: n=7, using one-way Anova with Dunnett's multiple comparisons post-test, * p<0.05; **<0.01). Graph in **D** represents APA enzymatic activities in the same cells that panel B/C after transfection of different shRNA constructs targeting APA. Small panel in D shows specific APA activity after use of RB150 inhibitor (shRNA scramble: n=10; shRNA APA-A: n=14; shRNA APA-B: n=9; shRNA APA-C: n=9; shRNA APA-D: n=8; NT: n=3).

Supplementary Figure 3: Immunohistochemical analysis of A β 42 using α -A β 42 antibody on twelve months old 3xTgAD transgenic mice previously injected with a scramble shRNA (shscr) **A** or an APA sequence targeting shRNA (shAPA) **B**.

Supplementary Figure 4: Graph A represents perimeter of A β 42 positive plaques in μ m and graph B represents area of A β 42 positive plaques (in μ m²) on twelve months old 3xTgAD transgenic mice previously injected with a scramble shRNA (shscr) or an APA sequence targeting shRNA (shAPA). Data are represented as mean +/- SEM, (for shRNA scramble; n=5 (mean of 10 to 20 pictures per mouse), for shRNA APA: n=8 (mean of 6 to 12 pictures per mouse)); statistical analysis was performed using Mann-Whitney test.

Supplementary Figure 5: Graph **A** represents the lysosomal structure in different conditions *in vivo* with lysosomes of category I (arrowhead yellow) and lysosomes of category II (arrowhead red). **B/C** correspond at the quantification of categories lysosomal (average 19 pictures/conditions/2 mice) and at area lysosome of category II (\pm 90 lysosomes/condition/2 mice). Statistical analysis was performed using Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons post-test. **D** represent the expression of lysosomal proteins deregulated in Alzheimer's disease (#1-3: 3xTgAD shScr; #4-6: 3xTgAD shAPA) where a slight modification to p62.

Supplementary Figure 6: Twelve months old WT and 3xTgAD transgenic mice injected either with a scramble shRNA (shscr) or an APA sequence targeting shRNA (shAPA). In **A**, graph shows retention time on Rotarod arm for WT and 3xTgAD mice infected with a scramble shRNA (shscr) or an APA sequence targeting shRNA (shAPA), while **B** graph represents time spend in the center of an open field test. **C** represents visual performance (Cued test) for WT and 3xTgAD mice infected or not with viruses coding for scramble or APA shRNA. Statistical analysis was performed using Anova test (WT shRNA scramble: n=11; WT shRNA APA: n=12; 3xTgAD shRNA scramble: n=9; 3xTgAD shRNA APA: n=12) ****p<0.01.

Supplementary Figure 7: **A** representations of swimming mice during the probe test and quantification in **B** (different part of swimming pool). Numbers of entry in different quadrant of MWM are showed in **B** (NW: North West, SW: south west, NE: north east, SE: south east.). Statistical analysis was performed using InVivoStat test (**p<0.005).

Supplementary Figure 8: Eleven months old WT and 3xTgAD transgenic mice treated either with daily intraperitoneal injections of physiological serum or RB150 (15mg/kg). In **A**, graph shows retention time on locomotion test for WT and 3xTgAD mice treated or not with RB150 while **B** graph represents time spend in the center of an open field test. **C** represents visual performance (Cued test) for WT and 3xTgAD mice treated or not with RB150. (WT serum: n= 10; WT RB150: n=10; 3xTgAD serum: n= 8; 3xTgAD RB150: n= 8). **p<0.01.

	Age (years)	Gender	PMD (h)	Braak's NFT stage [#]
Brain samples used in enzymatic activities and Elisas analyses				
Control	71	Male	26	-
Control	84	Male	32	-
Control	71	Female	15	-
Control	60	Female	28	-
Control	89	Female	12	-
Control	52	Female	29	-
Control	61	Male	20	-
ALS	62	Female	44	-
ALS	55	Male	21	-
ALS	62	Female	21	-
AD	68	Female	51	I-II
AD	68	Female	10	I-II
AD	92	Female	NA	III
AD	70	Male	31	III
AD	81	Female	60	IV
AD	80	Female	51	V
AD	80	Male	23	V
AD	65	Male	70	V
AD	84	Female	81	V
AD	78	Female	18	VI
AD	81	Male	19	VI
AD	65	Female	41	VI
AD	89	Female	26	VI
AD	91	Female	34	VI
AD	55	Female	58	VI
AD	75	Female	7	VI
AD	81	Female	NA	VI
AD	82	Female	NA	VI
Brain-derived slices used in immunohistochemistry analyses				
Control	55	Male	NA	-
AD	81	Male	NA	II
AD	77	Female	NA	IV
AD	83	Male	NA	VI

Table 1: Characterization of the sporadic AD cohort. PMD: Post mortem delay, h: hours, NA: not available. Controls are brain samples isolated from post-mortem patients diagnosed as negative for several neuropathologies. Control brains are samples diagnosed with Amyotrophic lateral sclerosis that were negative for AD pathology. [#] Braak and Braak's NFT stage, (-) means no NFT detection.

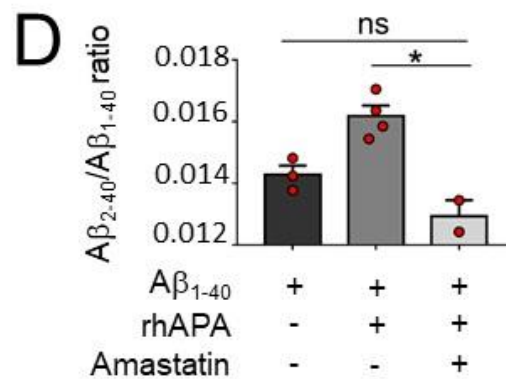
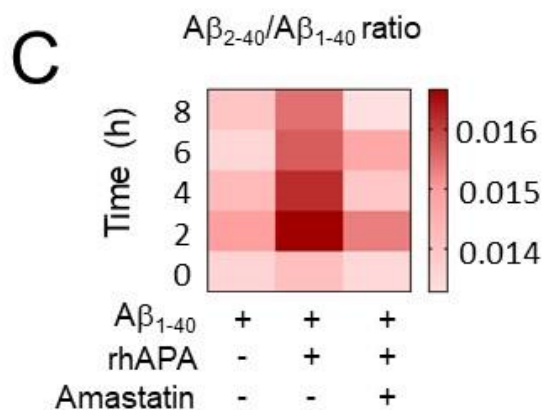
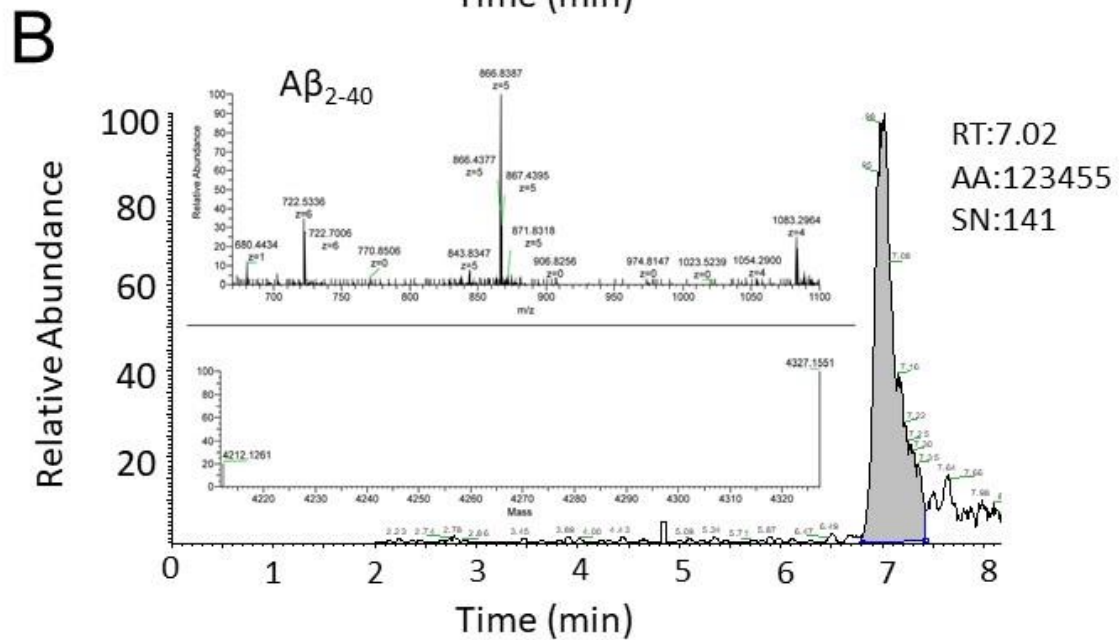
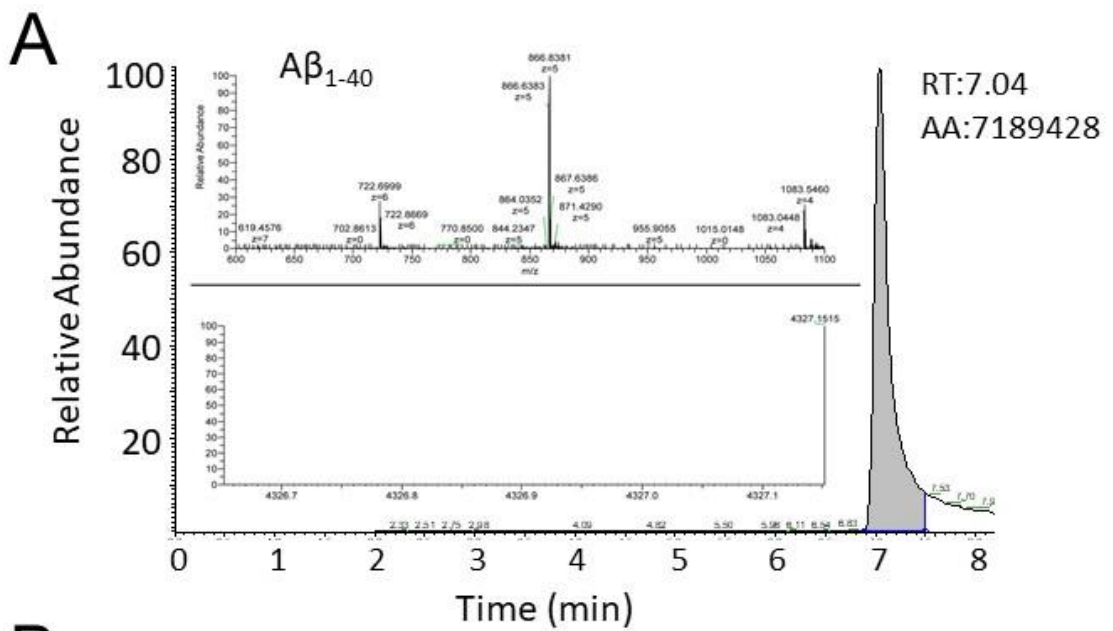


Figure 1. Valverde et al.

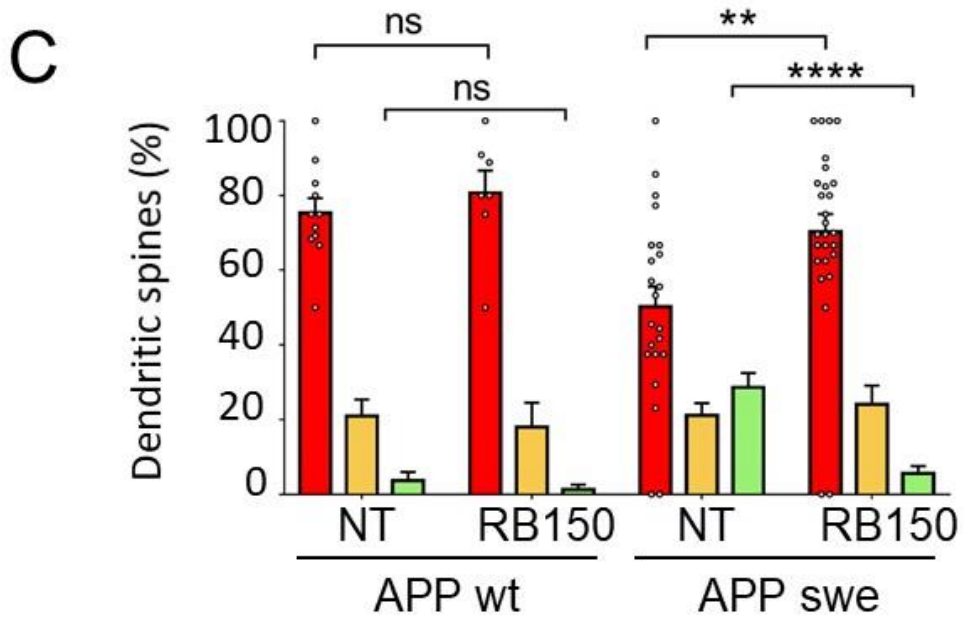
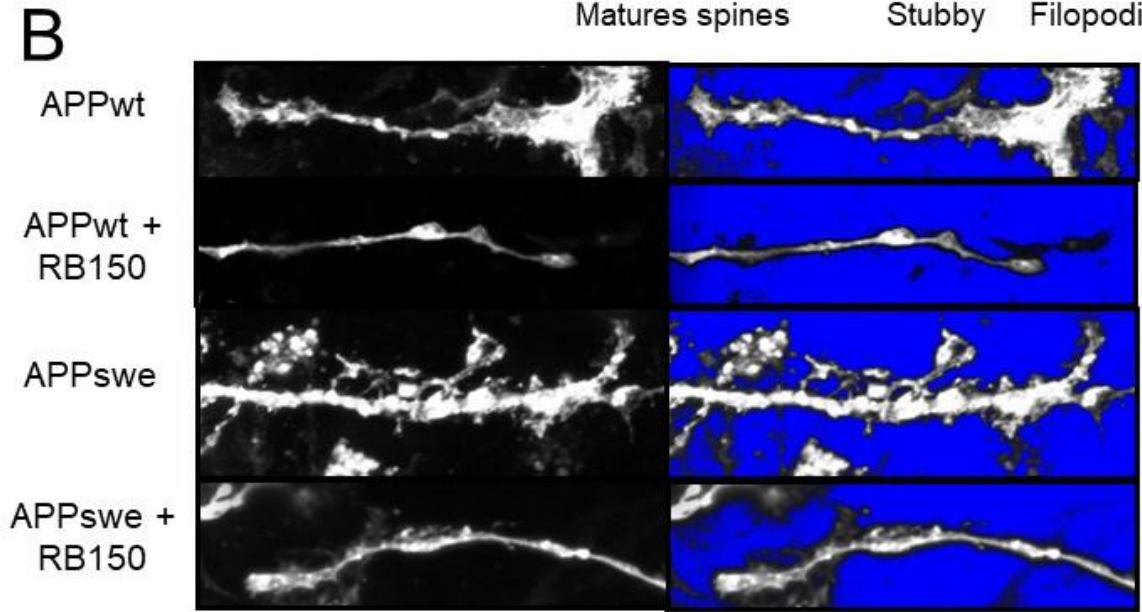
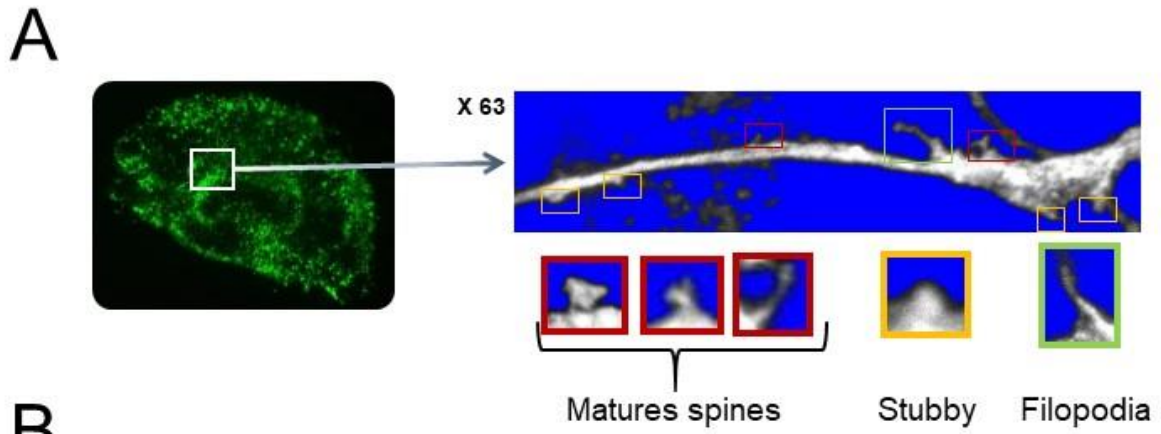
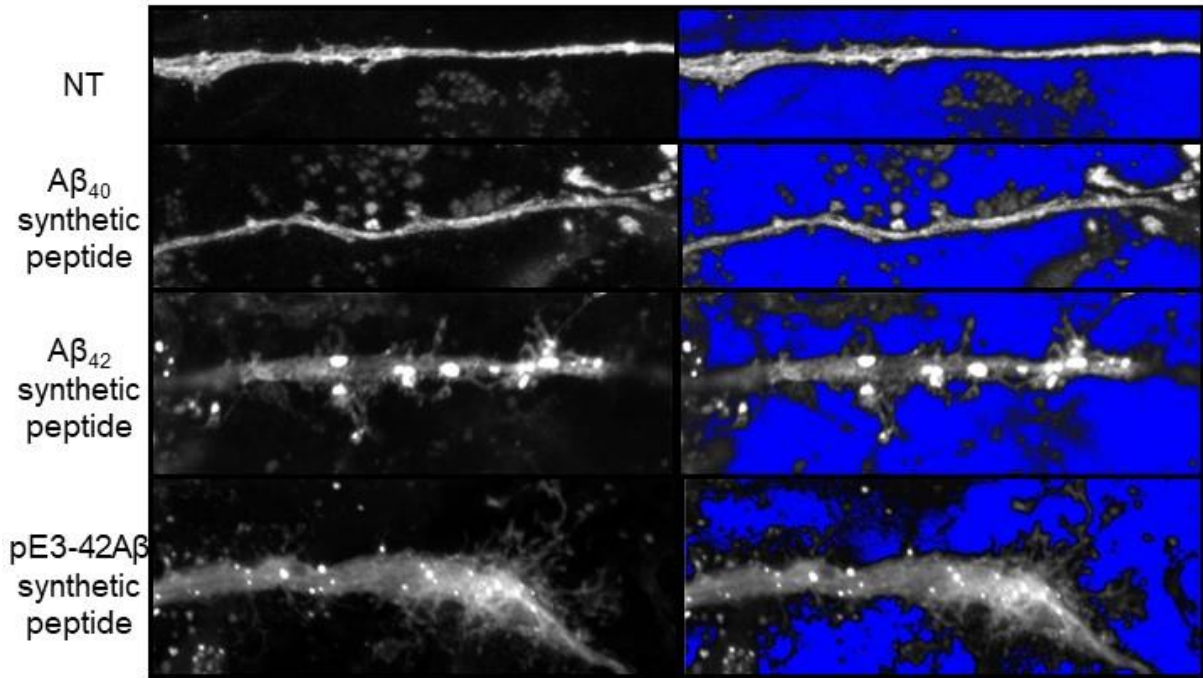


Figure 2. Valverde et al.

A



B

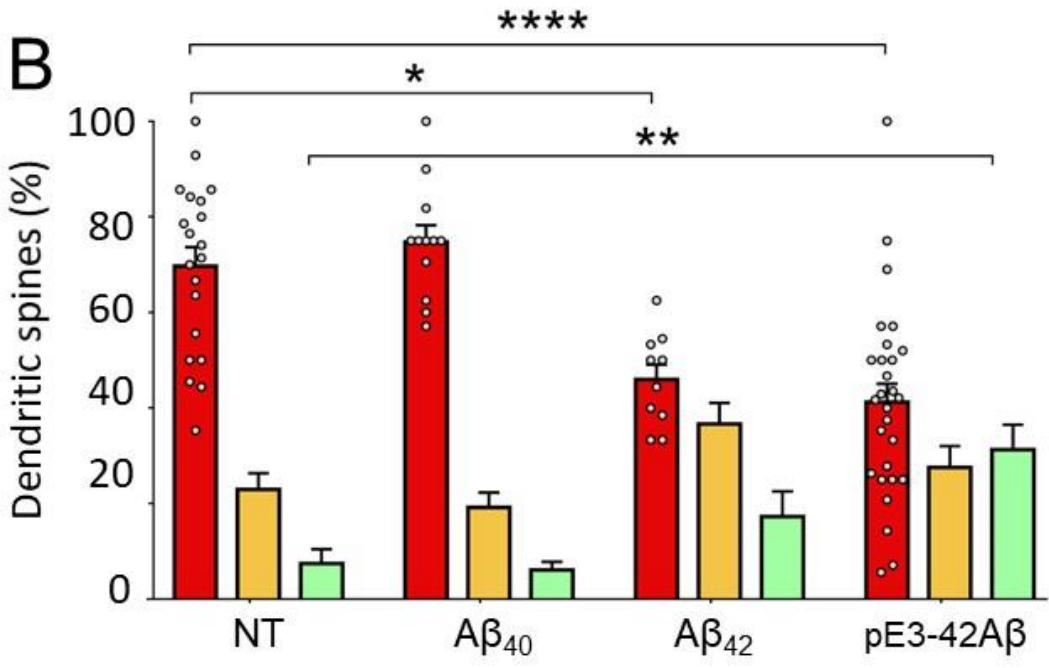


Figure 3. Valverde et al.

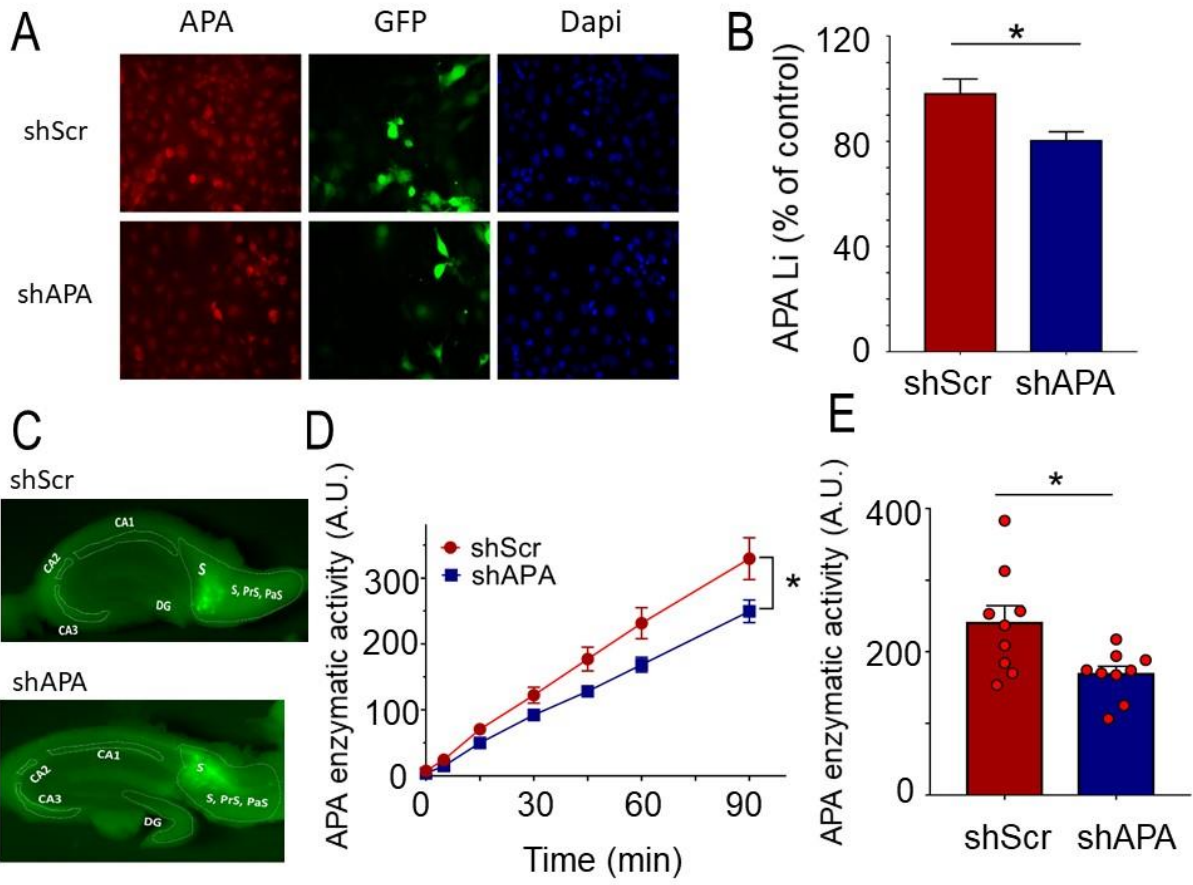


Figure 4. Valverde et al.

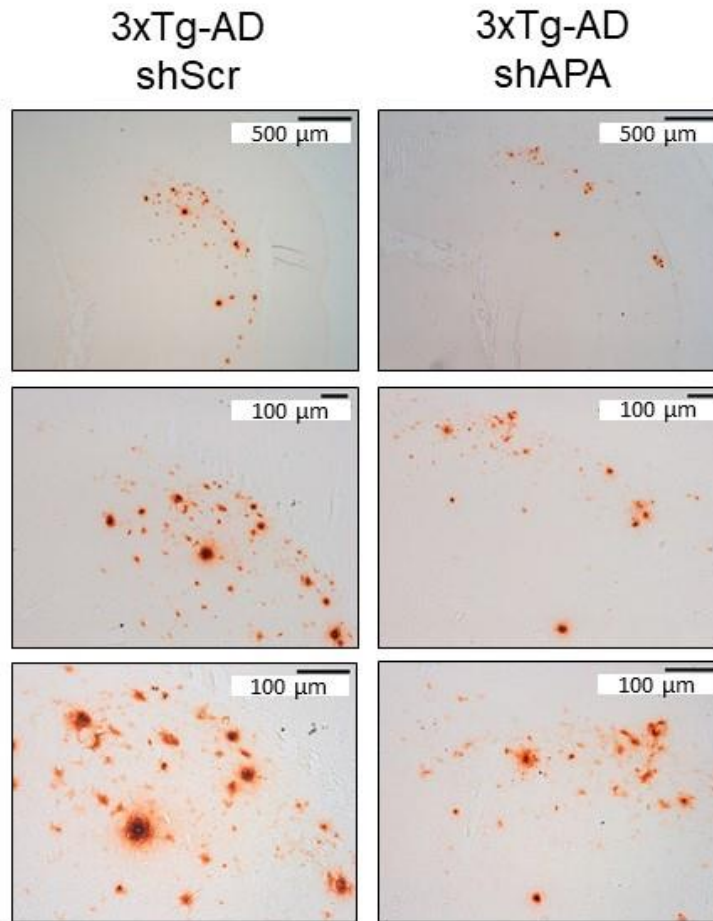
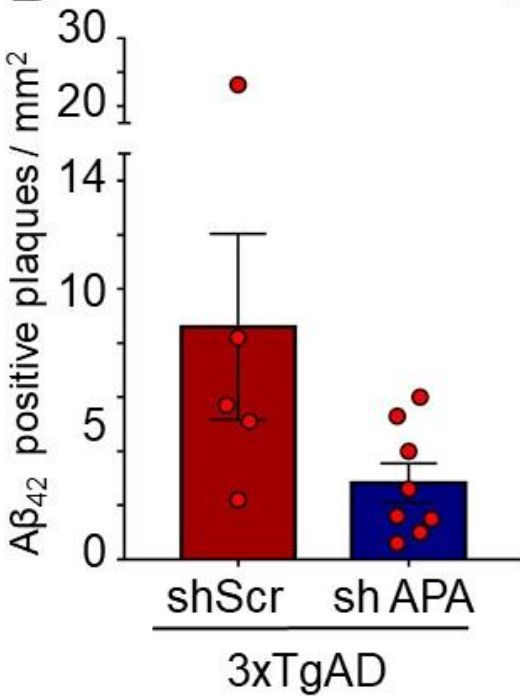
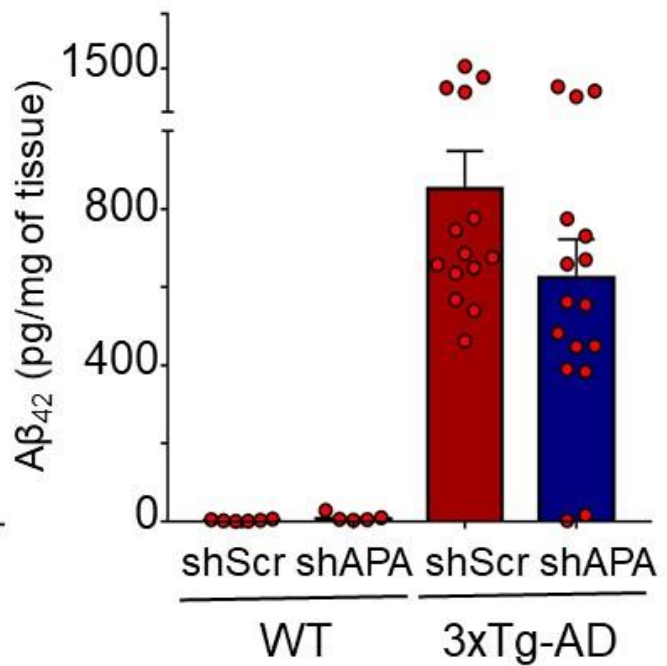
A**B****C**

Figure 5.Valverde et al.

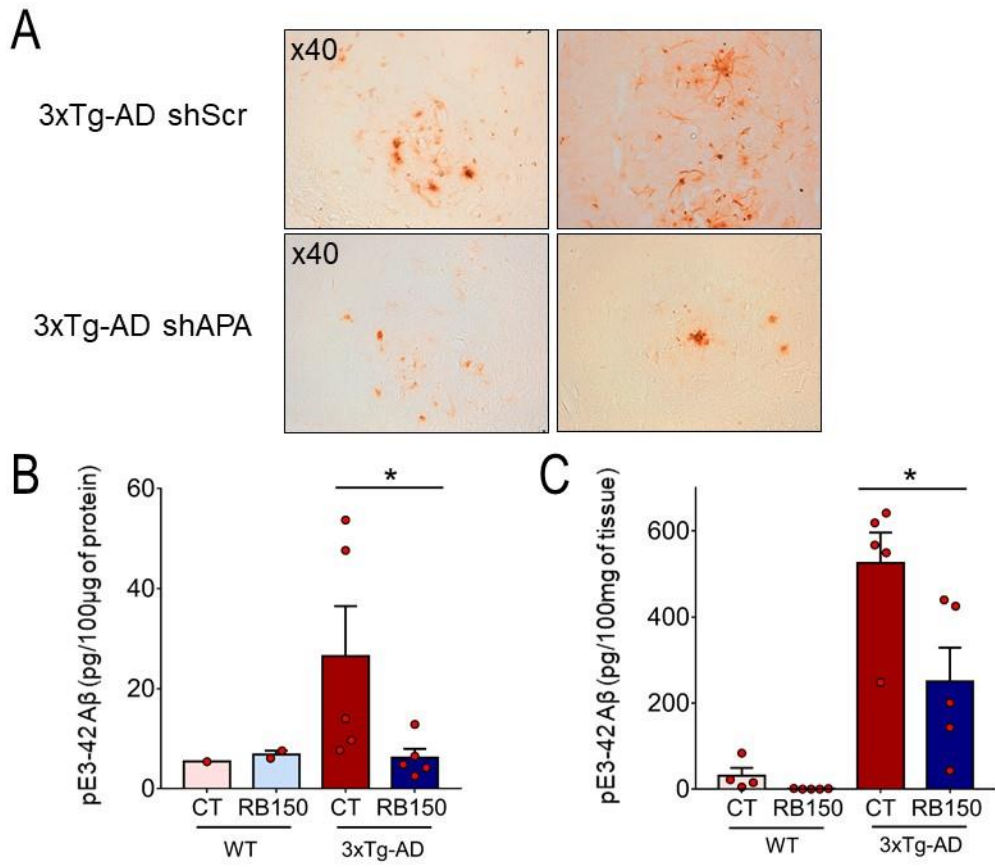


Figure 6. Valverde et al.

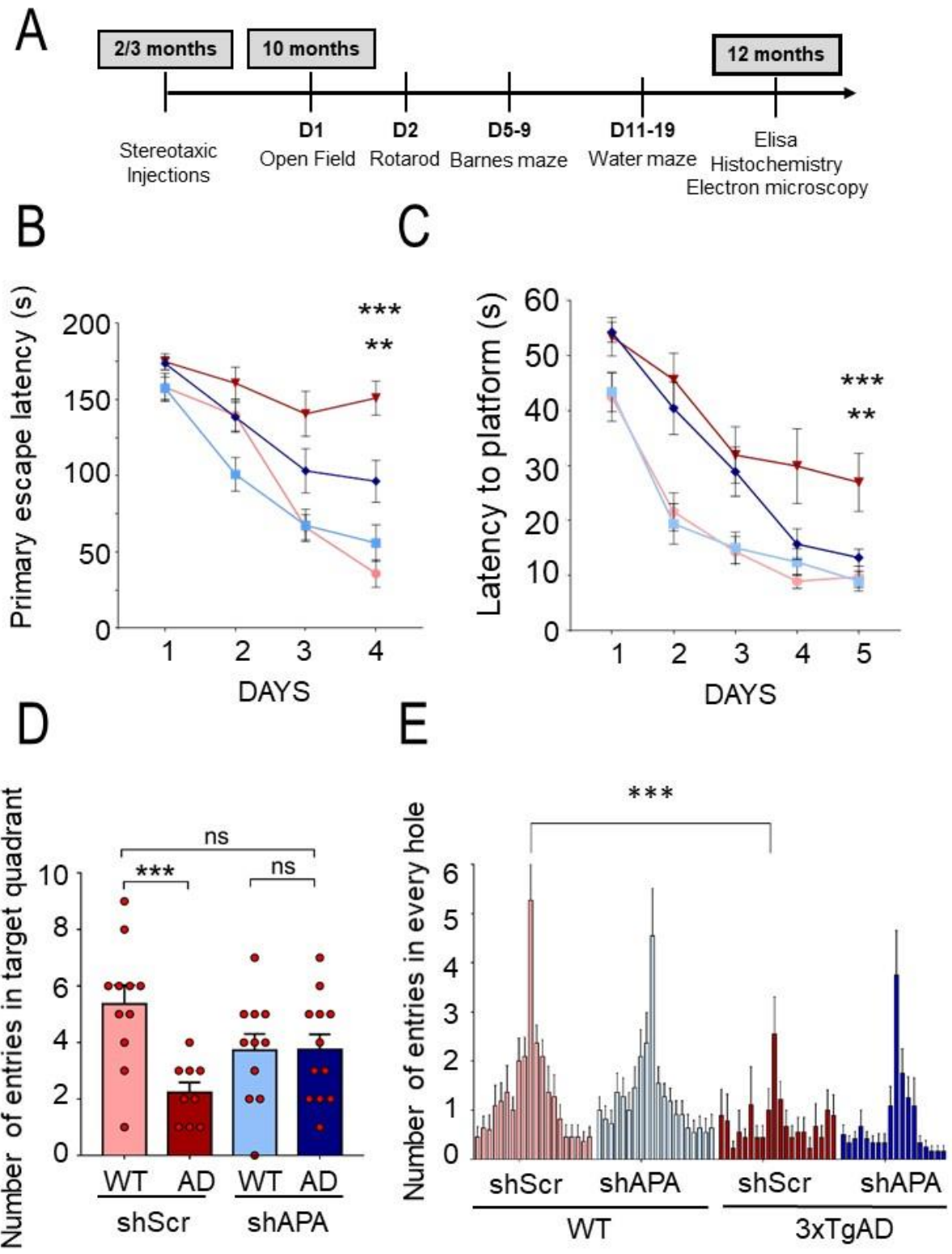


Figure 7. Valverde et al.

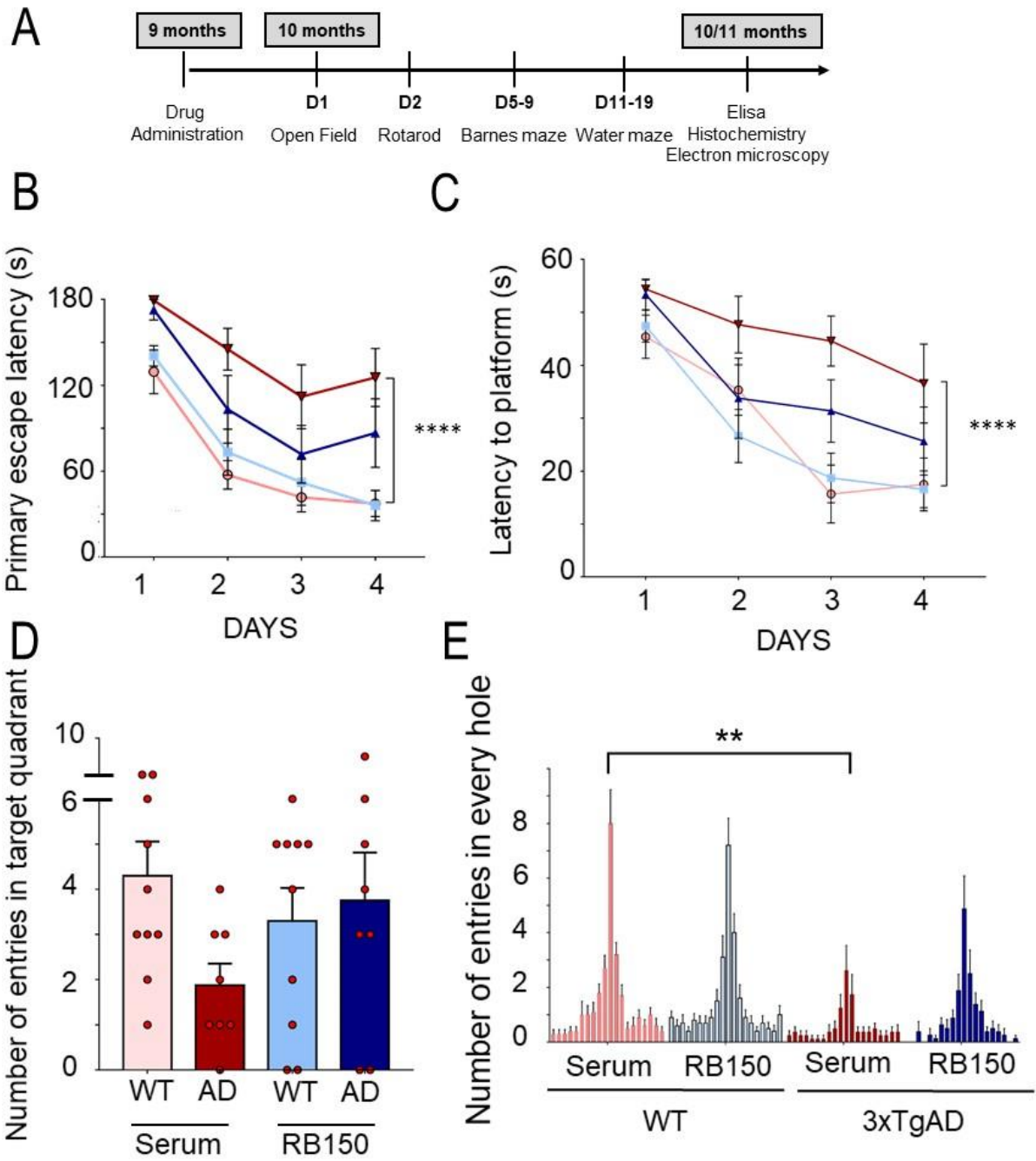


Figure 8. Valverde et al.

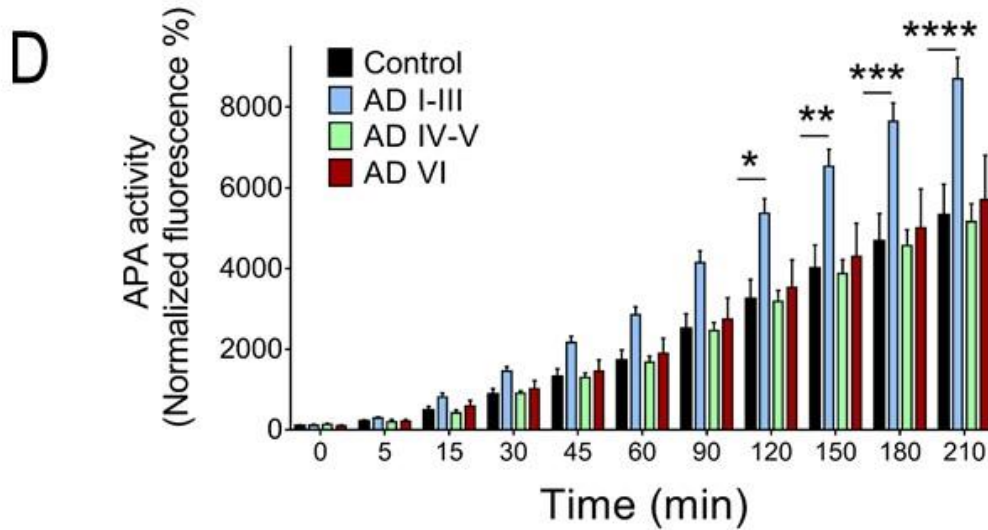
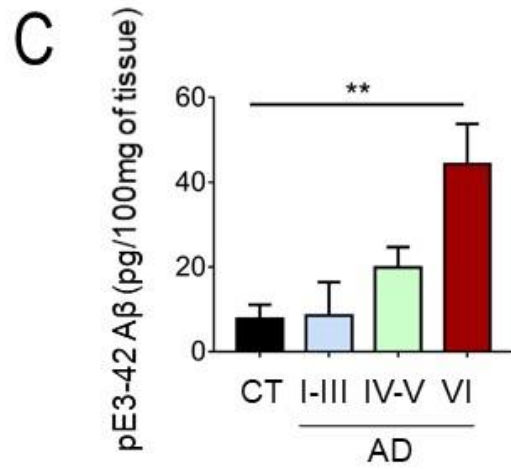
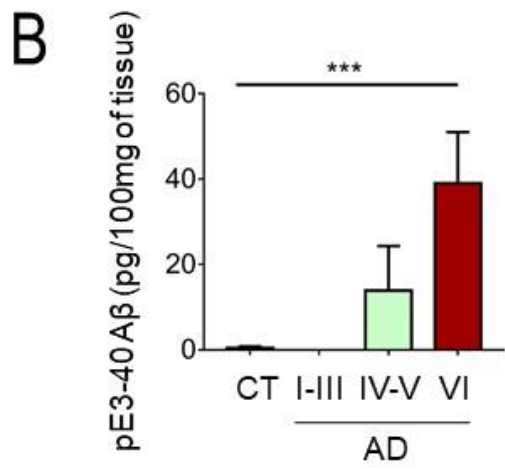
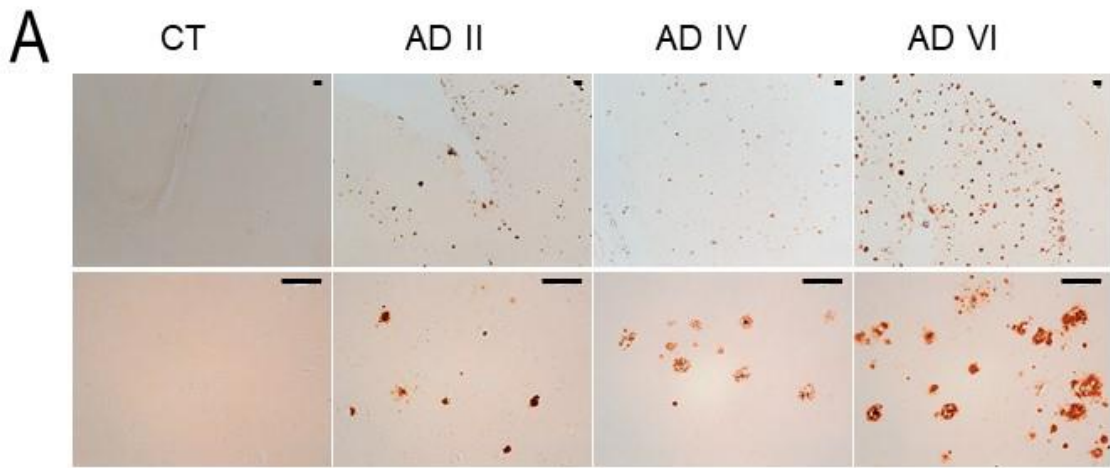
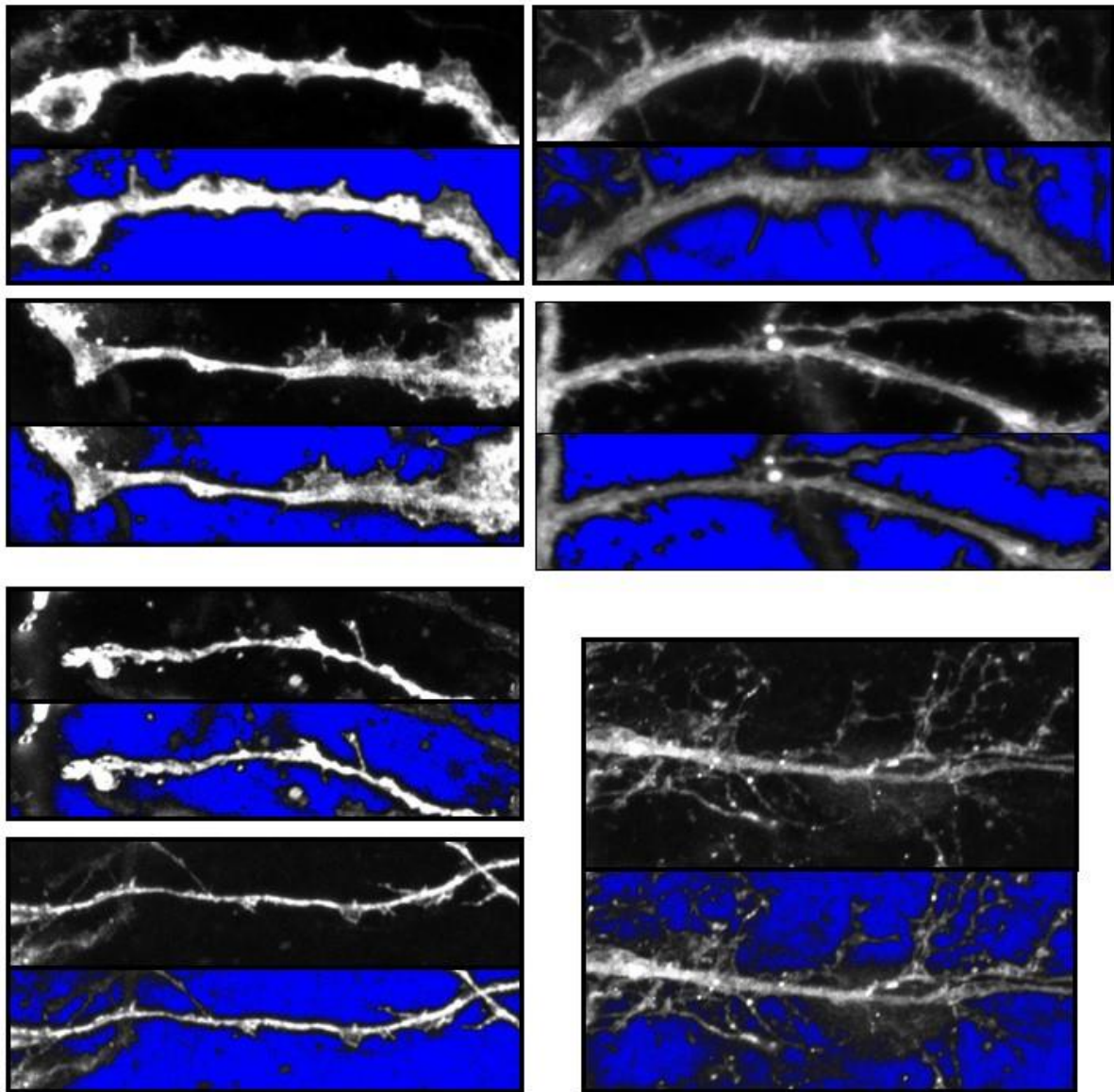


Figure 9. Valverde et al.

x63 Lentivirus APPwt

x63 Lentivirus APPswe

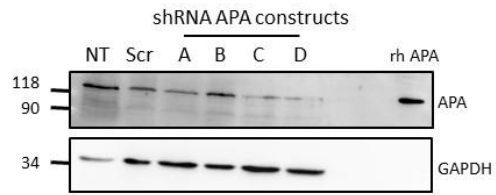


Suppl Figure 1. Valverde et al.

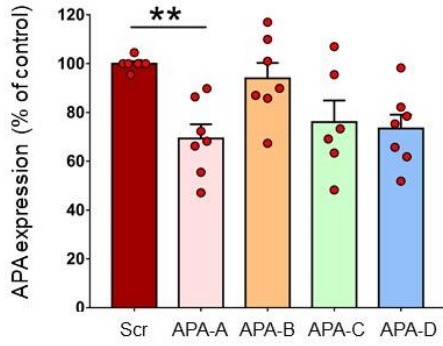
A

shRNA	Sequences
APA-A	CAGGCTGCTGACTTCATCAATCCAGTTC
APA-B	CCTGATGTCTTCACATCCAGTGGTCGTCA
APA-C	TCTGAGAATGCTCCAAGACTGGATAACAC
APA-D	AGAGCAAGTCTGGAGACGGTGAAGAACA
scramble	GCACTACCAGAGCTAACTCAGATAGTACT

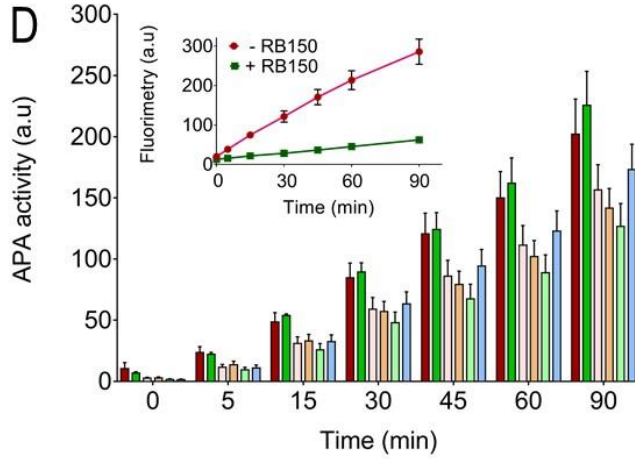
B



C

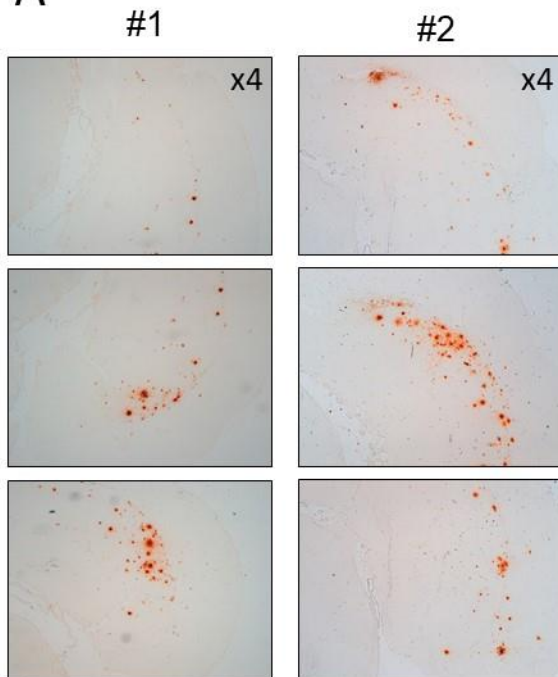


D

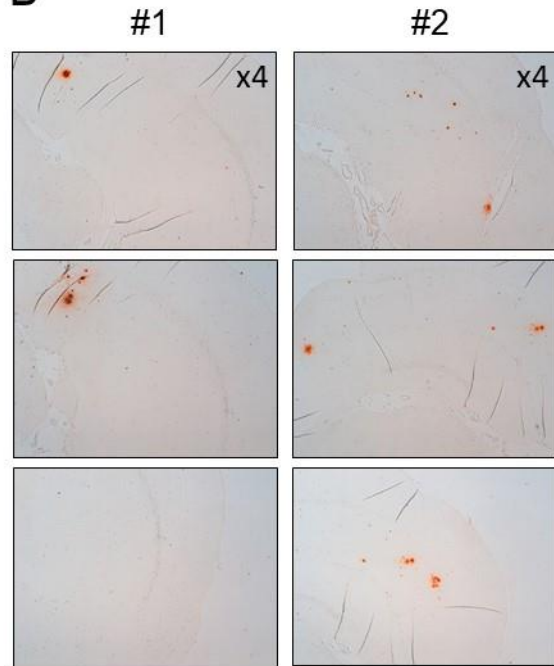


Suppl Figure 2. Valverde et al.

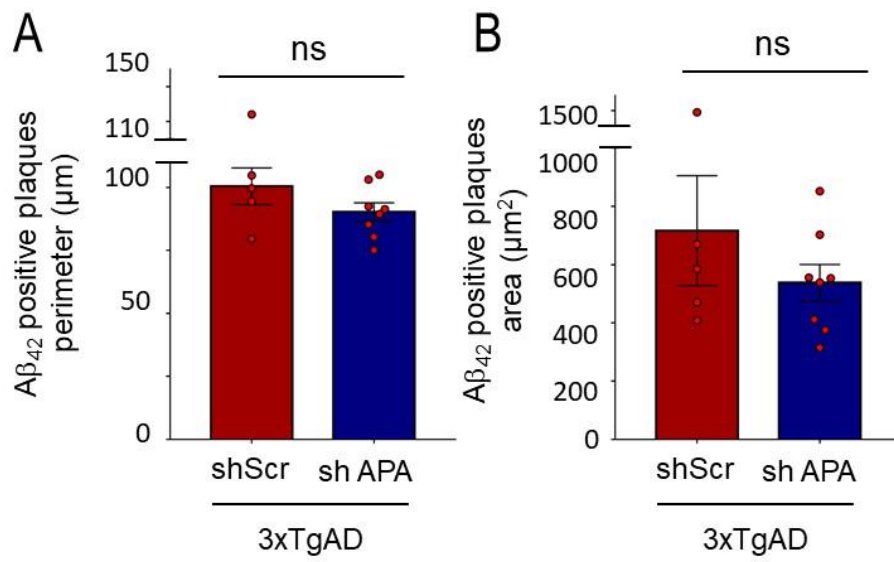
A



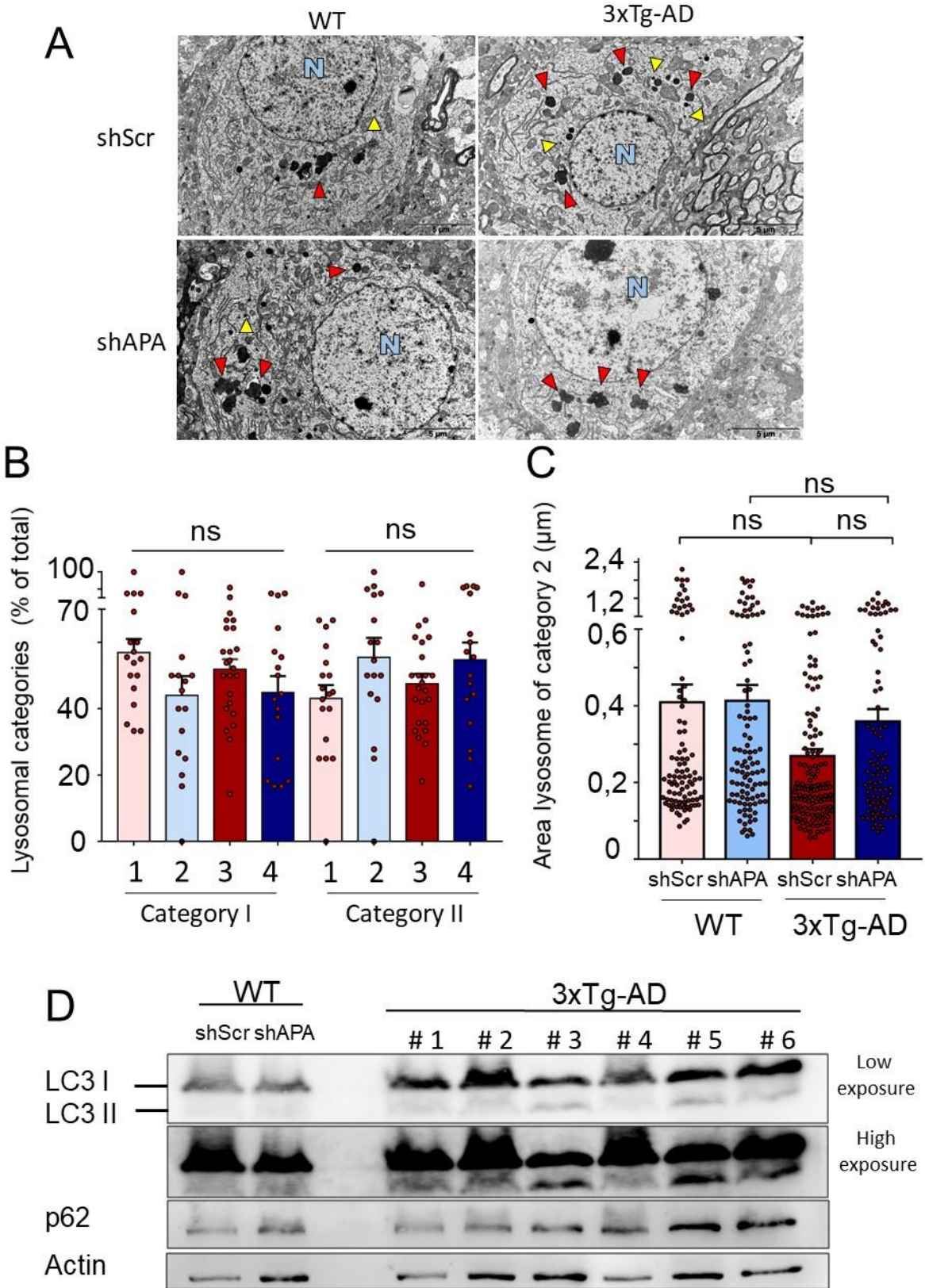
B



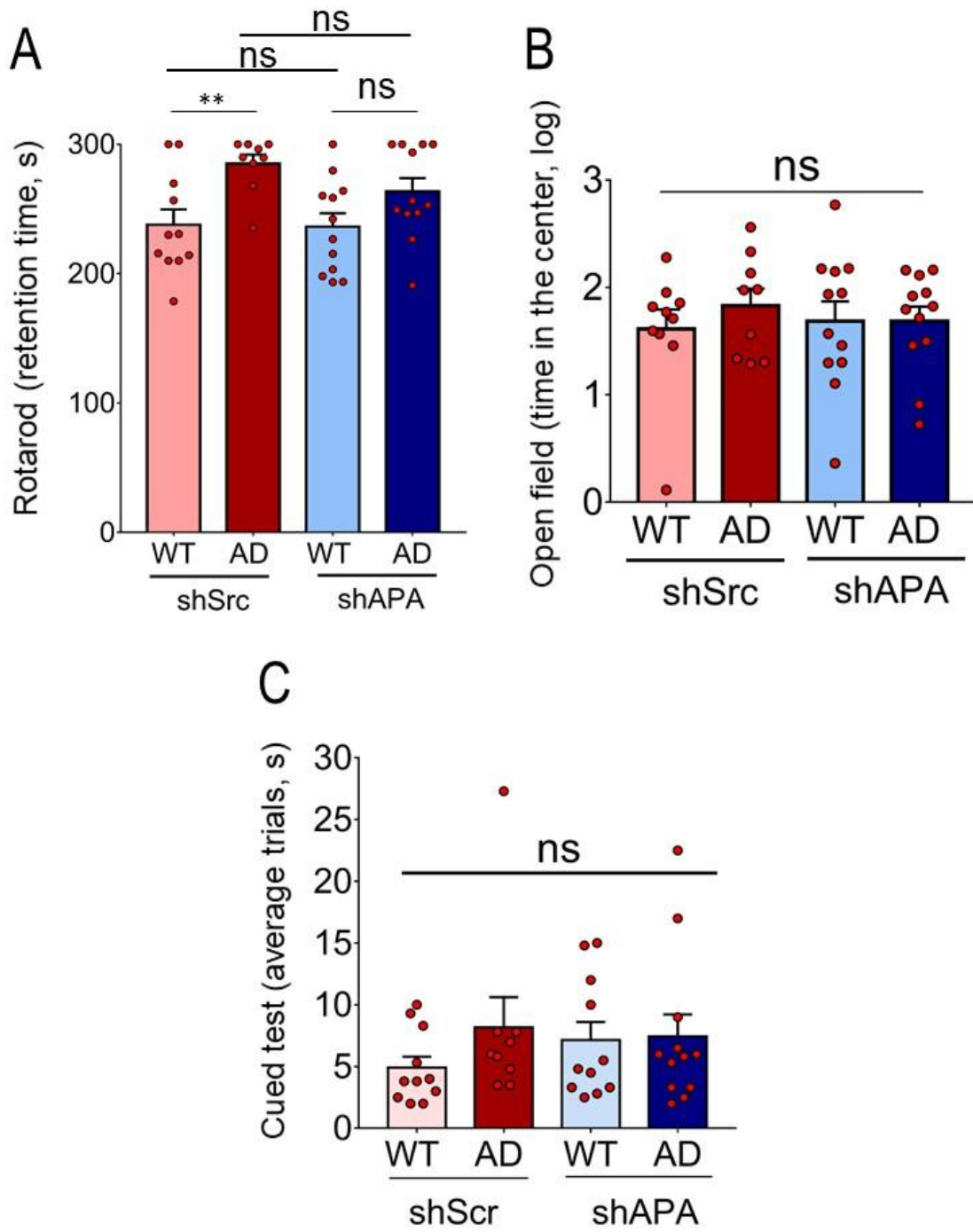
Suppl. Figure 3. Valverde et al.



Suppl. Figure 4. Valverde et al.

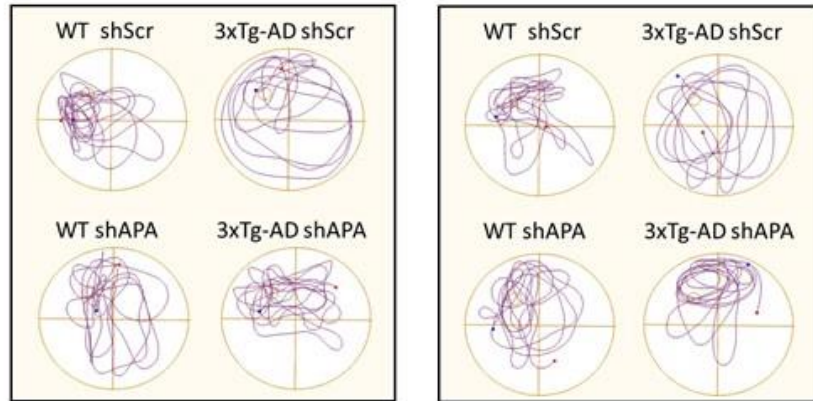


Suppl. Figure 5. Valverde et al.

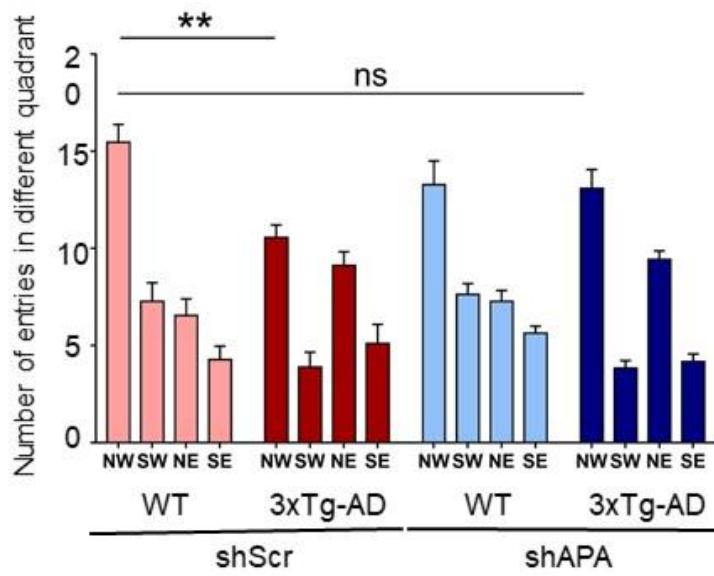


Suppl. Figure 6. Valverde et al.

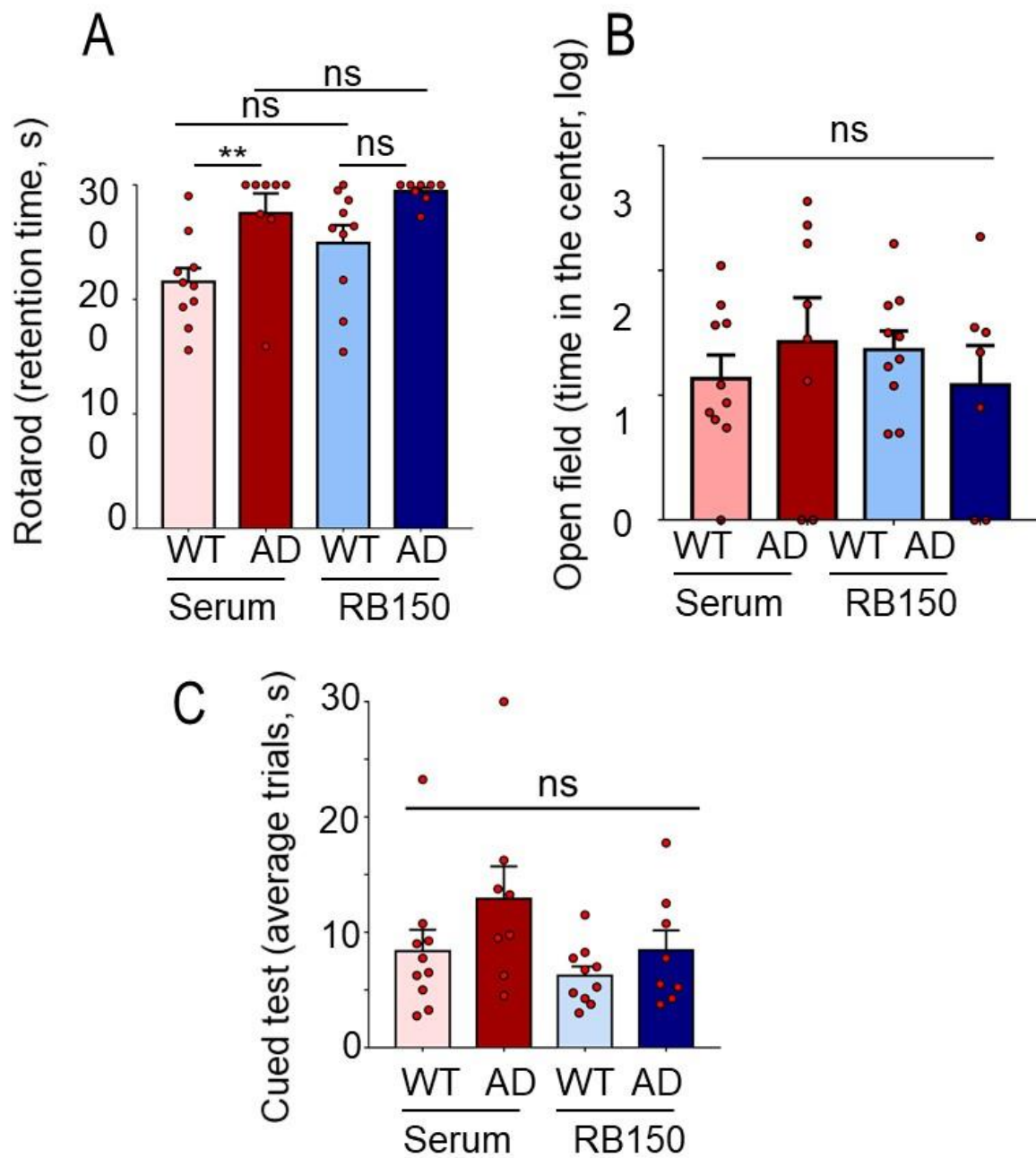
A



B



Suppl Figure 7. Valverde et al.



Suppl. Figure 8. Valverde et al.

Annexe de l'Article 1 : Données non publiées

Dans le cadre de cette thèse, des résultats préliminaires non publiés et rapportés dans la discussion sont ajoutés dans cette partie, créant une perspective de projet. En effet au cours des expériences et des mises aux points, nous avons pu observer une implication, plus ou moins indirecte, d'APA dans les cellules gliales avec une présence des formes toxiques d'A β dans les cellules gliales ainsi qu'une augmentation de son activité endogène dans les cellules BV2 (cellules microgliales murines) comparées aux HT22 (neuroblastomes murins). Nous ajoutons également l'effet mitigé du marquage Nu1 et 4G8 dans les souris ayant reçu le RB150 après un mois de traitement par gavage, développé dans la discussion, ainsi que la quantification du nombre de plaques amyloïde dans les souris traitées avec le RB150 de manière chronique en intrapéritonéale et à un âge plus jeune. Par ailleurs pour analyser les potentielles modifications cellulaires, nous avons voulu analyser de manière macroscopique l'effet de l'invalidation d'APA sur la structure mitochondriale et lysosomiale, voies altérées dans le cas de la MA.

A β _{pE3-x} accumulé dans les cellules gliales et neuronales dans le modèle murin 3xTg-AD.

Après le traitement chronique des souris 3xTg-AD et 3xTg-WT de 15 mois par gavage (Figure 29), nous observons une forte présence des A β _{pE3-x} dans les cellules gliales (Figure 29.A) en comparant la morphologie cellulaire avec le marquage GFAP et Iba1 (Figure 29.B) Parallèlement, le démasquage au citrate de sodium révèle un marquage ponctiforme dans les cellules neuronales reflétant une accumulation dans les compartiments lysosomiaux. L'agrégation de ce peptide dans les cellules gliales est surprenante puisque dans notre modèle, de nombreux autres marquages du peptide A β n'ont jamais permis d'observer ce type de marquage et les transgènes de ce modèle murin sont spécifiquement exprimés dans la population neuronale. Il est très connu que l'excès du peptide A β entraîne une activation microgliale et astrocytaire et aggrave la pathologie. En effet, la formation de l'A β _{pE3-x} et son agrégation dans ces cellules pourrait être impliqué dans l'astrogliose et la microgliose. De plus, une équipe germanique en 2015 montre également une formation de l'A β tronqué en région N-terminale dans les cellules gliales (Oberstein et al. 2015). Cependant qu'en est-il d'APA et de DPP4, ne sont-elles pas responsables de la génération de ces formes tronquées d'A β dans ces cellules et jouent-elles d'autres rôles ? Par microscopie électronique, nous avons pu apercevoir

une augmentation de la présence de microglie « active » dans les souris invalidées avec le shRNA APA (données non montrées) dans les souris 3xTg-AD, argument supplémentaire sur la contribution d'APA dans la neuroinflammation développée dans la discussion.

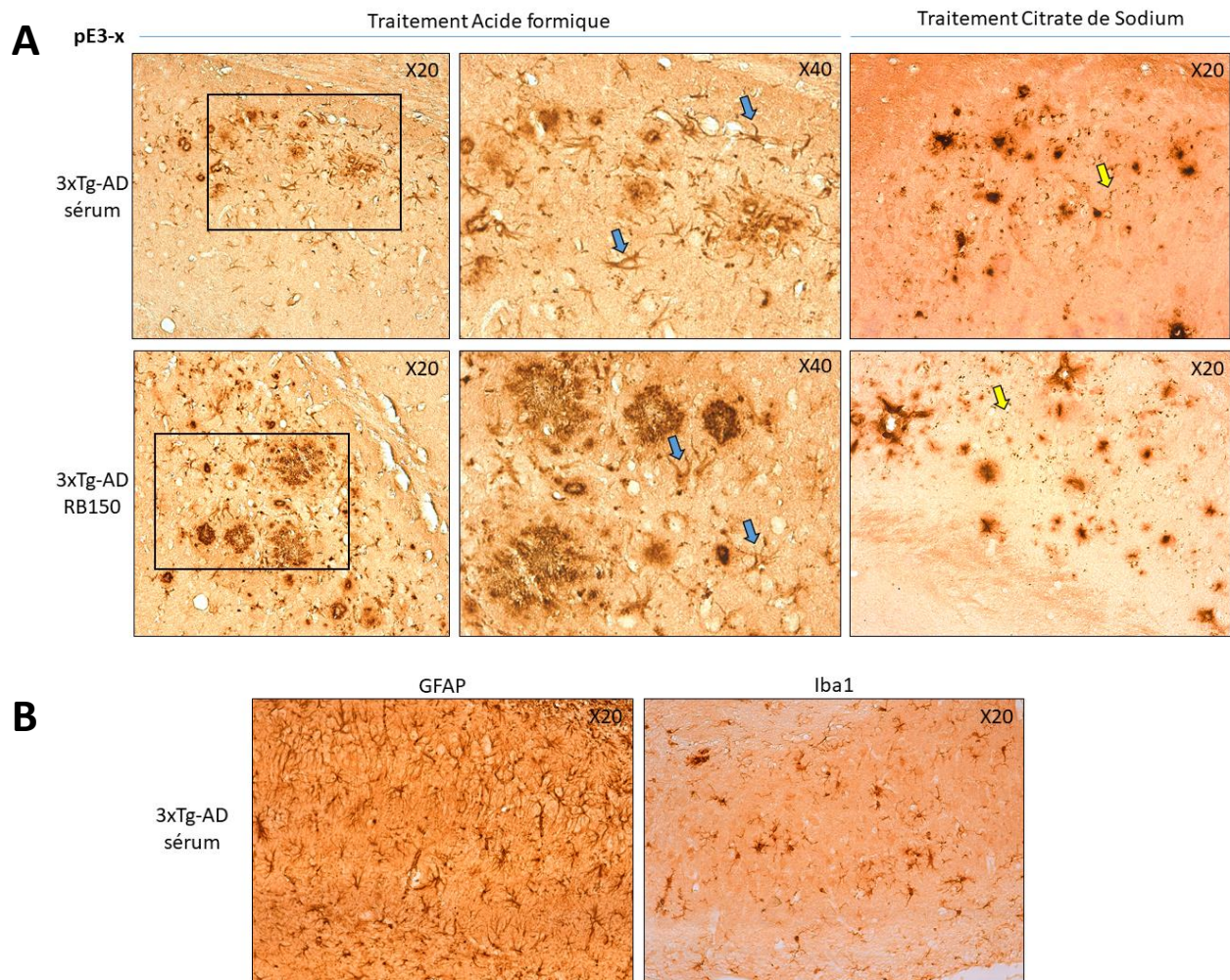


Figure 29 : Immuno-marquages des formes $A\beta_{pE3-x}$ dans les cerveaux murins après traitement pharmacologique au RB150. A : Images montrant la présence des formes $A\beta_{pE3-x}$ au niveau du subiculum dans les souris 3xTg-AD, traitées ou non avec le RB150. Le marquage révèle une forte accumulation des formes tronquées d' $A\beta$ en extracellulaire dans les plaques séniles et en intracellulaire dans les cellules gliales (flèche bleue) après un démasquage à l'acide formique et dans les neurones (flèche jaune) après un démasquage au citrate de sodium. B : Images montrant l'expression de la GFAP et d'Iba1, marqueurs spécifiques des cellules microgliales

et astrocytaires. La morphologie cellulaire de ces cellules est similaire avec celles visualisées par le marquage $A\beta_{pE3-x}$. Les cellules présentant cette forme toxique d' $A\beta$ sont plus du type « astrocytaire » que « microgliale ».

Activité enzymatique d'APA dans les cellules microgliales et neuronales murines.

La variation d'activité enzymatique d'APA et de DPP4 dans les cellules pourrait expliquer la présence des formes tronquées d' $A\beta$. Nous avons donc évalué l'activité enzymatique endogène dans les cellules BV2 (cellules microgliales murines) et les cellules HT22 (neuroblastomes murins). Les cellules microgliales présentent des activités APA et DPP4 (données non montrées pour DPP4) plus importantes que les cellules HT22 (Figure 30). Ce résultat préliminaire témoigne d'une variation d'activité enzymatique entre les types cellulaires dans le cerveau et ouvre une piste sur la présence des formes $A\beta_{pE3-x}$ dans les cellules gliales.

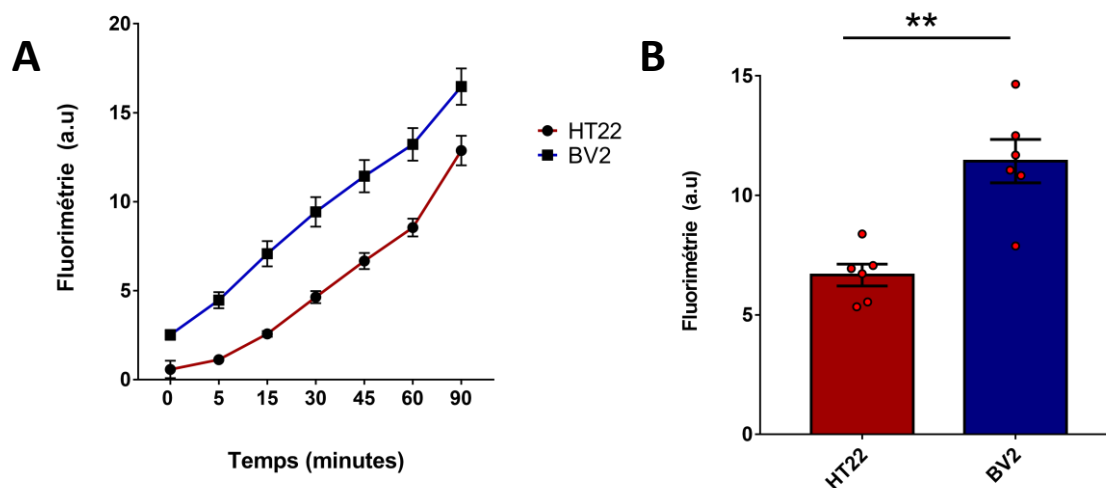


Figure 30 : Variation de l'activité enzymatique endogène d'APA dans les cellules neuronales et microgliales murines. A : Cinétique de l'activité endogène de l'aminopeptidase A sensible à l'inhibiteur dans les cellules BV2 et HT22. B : Activité enzymatique de l'aminopeptidase au temps 45 minutes (n=6).

Effets du traitement RB150 sur l'accumulation des protéines agrégées et sur l'A β total dans le modèle murin 3xTg-AD.

Dans cette partie, nous avons réalisé une étude immuno-histochimique des coupes coronales de cerveaux de souris traitées ou non avec le RB150, prodrogue ciblant l'aminopeptidase A. Grâce au traitement, l'immuno-marquage avec les anticorps Nu1 et 4G8 révèle une baisse de l'agrégation du peptide A β . Le marquage 4G8 révèle des plaques plus diffuses, à l'inverse des souris 3xTg-AD non traitées où les plaques séniles sont compactes (Figure 31). De même pour le marquage Nu1, l'intensité du marquage est moins soutenue dans les souris traitées au RB150. Sachant que l'A β _{pE3-42} détectée dans ces souris (Figure 6 de l'article 1) est réduit dans la fraction soluble et insoluble en Elisa et que ce fragment présente une forte propension d'agrégation, la baisse de l'agrégation concorde avec les résultats obtenus en Elisa. Cette mise au point sur un nombre restreint de souris et ces résultats encourageants nous ont permis d'entreprendre le traitement pharmacologique sur une cohorte de souris plus importante âgée de 9/10 mois et d'analyser leurs performances cognitives.

Effets du traitement RB150 sur la densité, l'aire et le périmètre des plaques amyloïdes dans le modèle murin 3xTg-AD.

Dans cette partie nous avons voulu, de la même manière que pour les souris invalidées avec le shRNA APA (Figure 5. Article 1), analyser l'effet du traitement avec le RB150, par une étude immuno-histochimique, sur la formation des plaques amyloïdes. Après un démasquage à l'acide formique, l'immunomarquage α -A β 42 révèle une légère tendance à la diminution des plaques amyloïdes, sans modification de l'aire ainsi que du périmètre de ces dernières (Figure 32). Cette expérience devrait être reproduite sur un plus grand nombre de souris et avec un traitement plus long afin d'atteindre un âge plus approprié (pour la détection des plaques), afin de confirmer cette tendance. De manière intéressante les souris traitées présentant de manière plus abondante les formes A β _{pE3-X} sont également celles ayant le plus grand nombre de plaques amyloïdes A β 42 positives (Données non montrées).

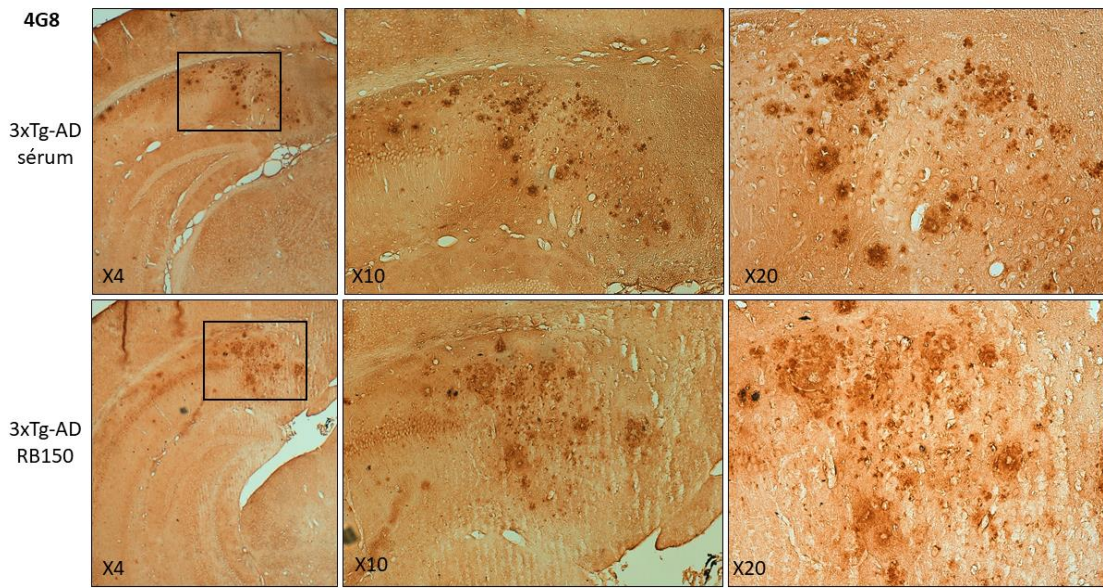
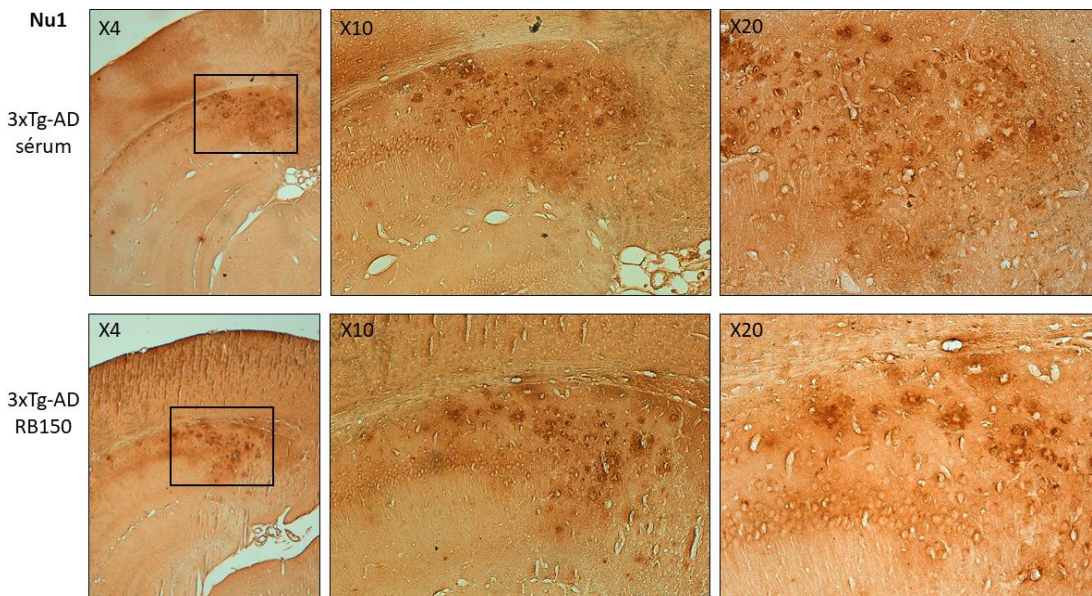
A**B**

Figure 31 : Marquages des protéines agrégées et de l'A β dans les souris 3xTg-AD, âgées de 15 mois traitées ou non avec le RB150. A : Images montrant la présence de l'A β réactif à l'anticorps 4G8. On peut noter une différence sur le dépôt amyloïde entre les 2 conditions. B : Images révélant l'accumulation de protéines agrégées dans le cerveau de souris 3xTg-AD traitées ou non avec le RB150.

Effets de l'interférent APA sur l'aire et le périmètre mitochondriale dans le modèle murin 3xTg-AD.

Afin d'éclaircir les voies cellulaires potentiellement impliquées dans ces effets bénéfiques de l'invalidation d'APA au niveau comportemental et anatomique, nous avons décidé d'analyser par microscopie électronique la structure mitochondriale (Figure 33, Figure 34) et lysosomiale (Figure Suppl 5, Article 1) de ces souris. Dans la Figure 33, macroscopiquement, nous pouvons effectivement visualiser les défauts structuraux des mitochondries dans les souris 3xTg-AD. Ce défaut ne semble pas être présent dans les zones « extension » et dans les souris 3xTg-AD invalidées pour APA. Après quantification (+/- 350 mitochondries par condition), l'aire mitochondriale est augmentée entre les souris WT et les souris 3xTg-AD et semble être rétabli dans les souris 3xTg-AD ayant le shAPA (Figure 34), de même pour le périmètre. Le manque de caractérisation moléculaire spécifique des mitochondries ne nous permet pas encore de comprendre clairement, pourquoi l'invalidation d'APA agirait sur le fonctionnement mitochondrial. Cependant, une hypothèse serait que les formes N-tronquées d'A β présentes dans la fraction mitochondriale chez des patients MA (données non montrées) agirait sur le fonctionnement mitochondrial et provoquerait des défaillances.

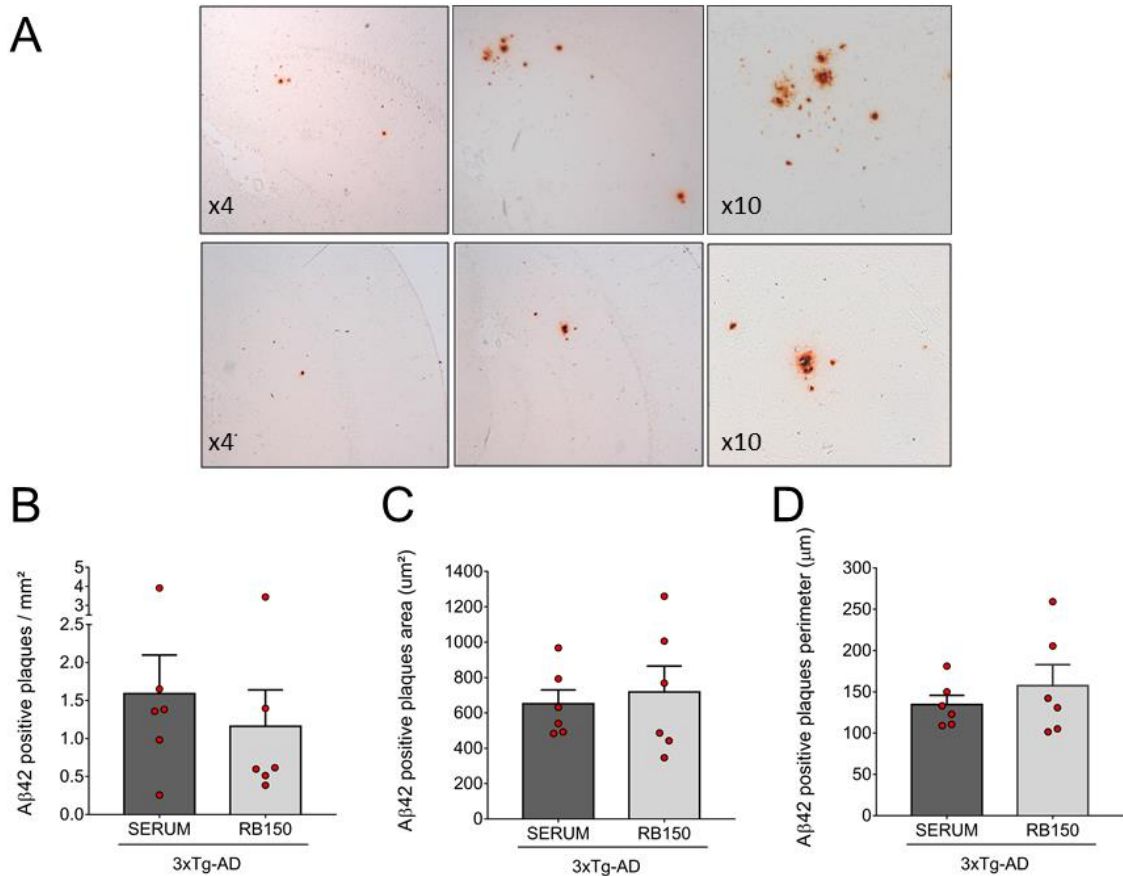


Figure 32: Immuno-marquage du peptide $A\beta_{42}$ dans les souris 3xTg-AD, âgées de 10-11 mois traitées ou non avec le RB150. A : Images montrant l'expression de l' $A\beta_{42}$ dans les souris 3xTgAD. B/C/D : Graphiques permettant d'étudier l'impact du traitement RB150 sur le nombre, l'aire et le périmètre des plaques amyloïdes dans notre modèle murin.

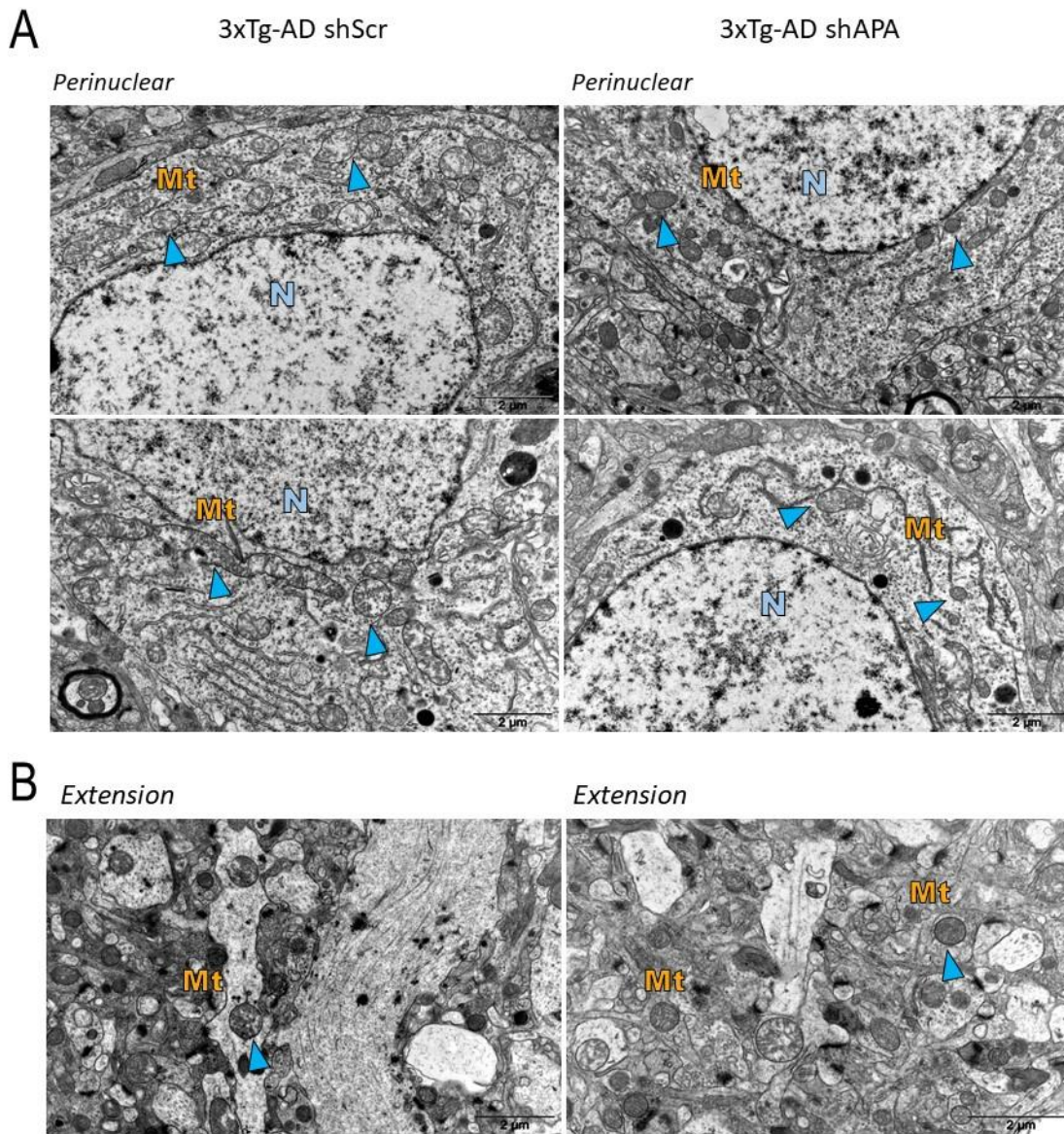


Figure 33: Images représentatives des morphologies mitochondriales dans les souris 3xTg-AD shScr et shAPA. Images démontrant la structure mitochondriale dans la zone périnucléaire (A) et dans la zone des prolongements (B), (tête de flèche bleu, Mt : mitochondrie).

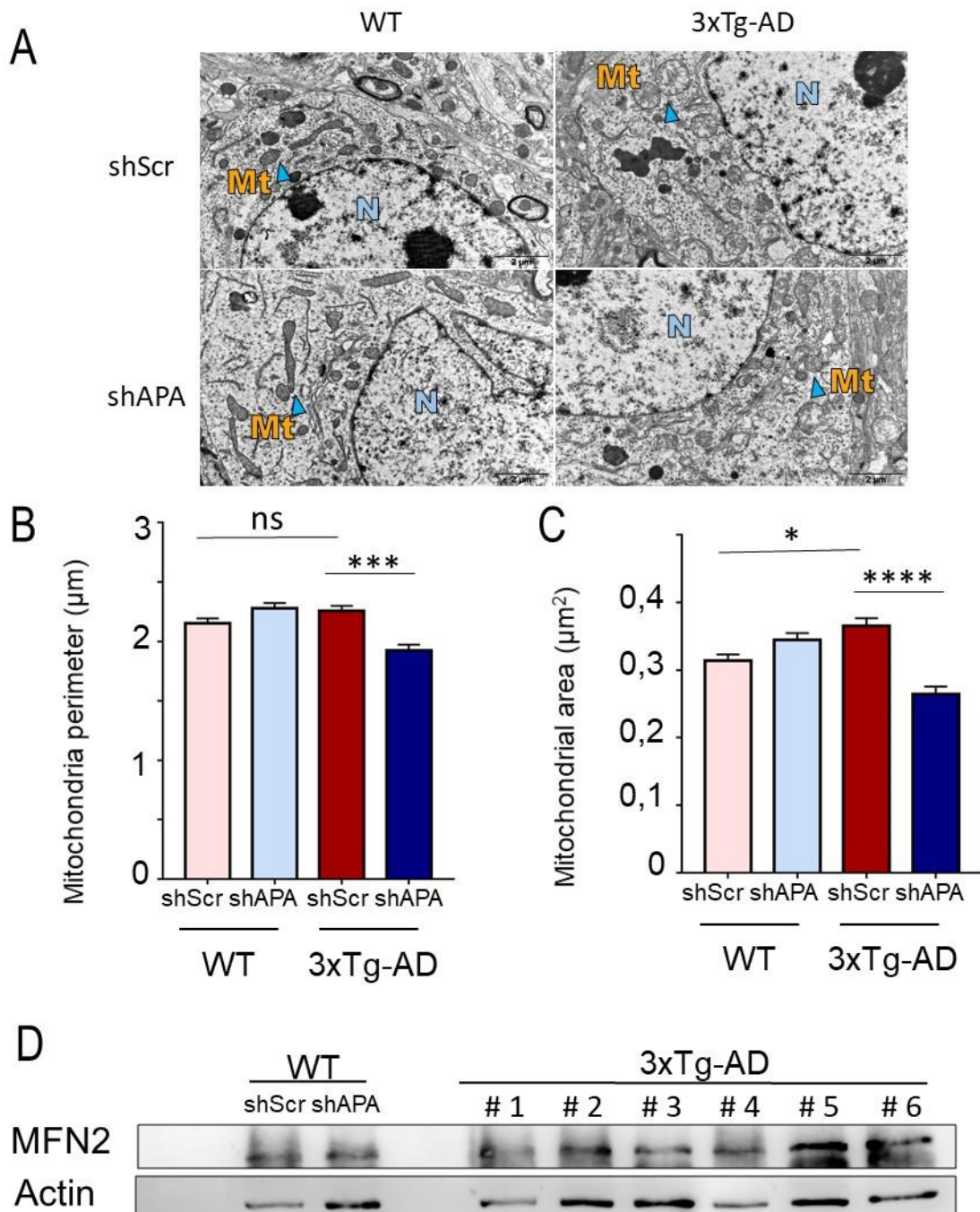


Figure 34: Effet bénéfique de l'inactivation d'APA sur la structure mitochondriale des souris 3xTg-AD. A Images représentant chaque condition expérimentale. B- Quantification du périmètre ou de l'aire (C) des mitochondries. D- Visualisation de la mitofusine 2 dans les différentes conditions.

C.ARTICLE 2 – Axe 2 : Objectif et résumé

« L'expression de la DPPIV est augmentée dans les cerveaux sporadiques de la maladie d'Alzheimer et contribue aux anomalies liées à la maladie d'Alzheimer chez les souris modèles. »

Dipeptidyl peptidase 4 accounts for Alzheimer's disease-like defects in a mouse model and its activity is increased in sporadic Alzheimer's disease brains.

A.Valverde, J.Dunys, C.Caillava, D.Debayle, T.Lorivel, AS.Gay , M.Chami et F.Checler

Actuellement en préparation pour soumission dans JBC

En parallèle de l'étude sur l'aminopeptidase A, la deuxième partie de mon projet était d'identifier l'impact de la Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) dans la troncation du peptide A β dans sa région N-terminale et d'analyser son niveau d'implication dans les caractéristiques anatomiques et symptomatiques de la maladie d'Alzheimer. Depuis 2013, une équipe d'Arménie et d'Allemagne s'intéresse à l'interaction de DPP4 avec le peptide amyloïde. En 2018, ces deux équipes ont mis en évidence la formation des formes toxiques d'A β _{PE3-X} par spectrométrie de masse.

Dans la même optique, mes résultats démontrent également la troncation du peptide A β ₁₋₄₀ en A β ₃₋₄₀ qu'en présence de DPP4 et de manière spécifique par spectrométrie de masse. Nous avons donc poursuivi ce projet en étudiant l'implication de cette enzyme par des invalidations pharmacologiques ou génétiques. Dans notre modèle *ex-vivo*, nous pouvons constater que l'application de la sitagliptine, un inhibiteur de DPP4, permet de favoriser une morphologie d'épines dendritiques matures dans des coupes organotypiques infectées par un lentivirus permettant l'expression de l'APP_{suédoise}. Par la suite, l'invalidation partielle de DPP4 par ARN interférent dans le modèle 3xTgAD révèle une diminution drastique de l'A β ₄₀ et de l'A β ₄₂ dans la fraction insoluble. Ces résultats concordent avec la diminution du nombre de plaques séniles A β ₄₂ positives et une amélioration cognitive des souris 3xTgAD dans la piscine de Morris après invalidation partielle de DPP4. Cependant, cette amélioration ne se retrouve pas dans le test de Barnes mais plusieurs hypothèses proposées dans la partie discussion peuvent répondre à cette différence de résultat. En parallèle, l'administration de la sitagliptine dans les

souris 3xTg-AD révèle des résultats moins nets mais on peut tout de même constater un effet bénéfique sur le niveau d'A β ₄₂ dans le cerveau, sur la charge en plaques et sur la préférence du trou cible (courbe de gausse) du test du Barnes Maze.



La contribution d'**Audrey Valverde** dans ce projet : La mise au point de l'ensemble des expériences, la production lentivirale, les injections lentivirales par stéréotaxie, l'imagerie, les Elisas, le comportement, la préparation et l'analyse des coupes organotypiques et l'analyse des données.

En conclusion, cette étude présente pour la première fois les conséquences de la troncation du peptide A β dans sa région N-terminale par la Dipeptidyl-peptidase 4 dans un modèle intégré : les souris 3xTg-AD.

Dipeptidyl peptidase 4 accounts for Alzheimer's disease-like defects in a mouse model and its activity is increased in sporadic Alzheimer's disease brains.

Audrey Valverde¹, Julie Dunys¹, Delphine Debayle¹, Thomas Lorivel¹, Anne-Sophie Gay¹, Mounia Chami¹ and Frédéric Checler¹.

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, team labeled "Laboratory of Excellence (LABEX) Distalz", 660 route des Lucioles, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

To whom correspondence should be addressed: Dr. Frédéric Checler, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire, CNRS UMR7275, 660 route des lucioles, 06560 Valbonne, France, Tel.: +334 93 95 34 60; Fax: +334 93 95 77 08; E-mail: checler@ipmc.cnrs.fr

Running Title: DPPIV contributes to Alzheimer's disease.

Keywords: pE3-A β , Dipeptidyl Peptidase 4, dendrites morphology, A β load, senile plaques, behavior, 3xTg-AD

ABSTRACT

The amyloid cascade hypothesis proposing a prominent role for full-length A β peptides is currently being questioned. Beside full-length A β , several N-terminally truncated fragments of A β could well contribute to AD setting and/or progression. Among them, pE3-A β appears to be one of the main components of early anatomical lesions in AD-affected brains. Little is known about the proteolytic activities that could account for the N-terminal truncations of full-length A β but they appear theoretically as the rate-limiting enzymes yielding the E3-A β sequence that undergoes subsequent cyclisation by glutaminyl cyclase. Here we investigated the contribution of DPPIV in E3-x A β formation and the functional influence of its genetic depletion or pharmacological blockade on spine maturation as well as on A β 42-positive plaques and A β 42 load in the 3xTg-AD mouse model. Further, we examined whether reduction of DPP4 could rescue learning and memory deficits displayed by these mice. Our data establish that DPP4 reduction alleviate anatomical, biochemical and behavioral AD-related defects. In agreement, we demonstrate that DPPIV activity is increased in sporadic AD brains. Thus, our data demonstrate that DPPIV participates in pE3-A β formation and that targeting this peptidase could be considered as an alternative strategy to interfere with AD.

Introduction

Alzheimer's disease is the main age-related neurodegenerative disease, the etiology of which remains a matter of questions. One of the main hypotheses referred to as the "amyloid cascade hypothesis" (1) postulates a key role of amyloid beta ($A\beta$) peptides accumulation (2) in various brain zones, including those controlling memory, a psychometric paradigm altered in AD that worsens as the disease progresses. However, the consistent failure of $A\beta$ -centric clinical trials aimed at reducing $A\beta$ load by immunotherapy or pharmacological targeting of γ -secretase (3,4) cast some doubt about the validity of the hypothesis (5). It remains that undoubtedly, genetic evidence brought a crystal-clear demonstration that APP-linked fragments could participate in the pathology. Several APP-related catabolites distinct from genuine full-length $A\beta$ were shown to account for some of early lesions of AD-affected brains and could well contribute to the pathology (6-11).

$A\beta$ itself is the product of a physiological APP processing (2,12,13) and display physiological/protective functions (14-16) but could be converted into shorter toxic fragments contributing to the pathology (17). Particularly interesting is the pE3- $A\beta$ fragment that undergoes a N-terminal dipeptide truncation that releases a E3- $A\beta$ peptide that is subsequently cyclized by glutaminyl cyclase (18,19). Numerous anatomical and biochemical evidence suggested that glutaminyl cyclase is involved in the conversion of E3- $A\beta$ into pE3- $A\beta$ but the most straightforward demonstration of its role was brought by studies showing that its pharmacological blockade or genetic depletion alleviates AD-like cognitive defects in AD mouse model (20).

Dipeptidyl aminopeptidase 4 is an exopeptidase that was formerly described, by mean of screening of a series of fluorogenic dipeptides, as an exopeptidase preferentially cleaving X-Pro sequence (21) and hence, was referred to as a post-proline dipeptidyl aminopeptidase (22). However, it appears that some of its natural substrates display harbor a N-terminal dipeptides X-Ala. This structural motive corresponds to the N-terminal sequence (Asp-Ala) of the $A\beta$ peptide. Therefore, DPP4 appears as a good enzyme candidate responsible for the rate limiting removal of this dipeptide. Indeed, few studies documented the fact that DPP4 could, in concert with glutaminyl cyclase, yield pE3-40/42 $A\beta$, *in vitro* (23) and that DPP4 inhibitors could prove useful as an AD treatment (24,25).

Here we show by mass spectrometry that human recombinant DPP4 releases the N-terminal dipeptide of synthetic A β 40 and in agreement, that a DPP4 specific inhibitor potentiates the recovery of full-length A β generated by APP-expressing human cells. We show that the pharmacological blockade of DPP4 by sitagliptin rescues dendrite morphological alterations in organotypic slices derived from mice infected with lentiviruses harboring the APP^{swe} sequence. Further, both sitagliptin and shRNA directed towards DPP4 reduce A β 42-positive plaques and A β load in 3xTg-AD mice brain. We also establish that DPP4 genetic reduction and/or sitagliptin partly alleviate cognitive defects assessed by the Morris Water Maze and Barnes Maze tests in 3xTg-AD mice. Finally, we document a Braak stage-dependent and transient augmentation of DPP4 activity in a cohort of sporadic AD brains. Altogether, our data firmly support the possibility that DPP4 could contribute to AD pathology.

Materials and methods

Mass Spectrometry

Synthetic A β 40 from Bachem (15ng/ μ l) was incubated for various time periods with recombinant human DPP4 (2ng/ μ l) (R&D System) or for 8 hours with or without DPP4 inhibitor p32/98 (100 μ M). Samples were collected at different time (0, 2, 4, 6 and 8 hours). Reactions were stopped after addition of formic acid (0,1%) then samples were subjected to spectrometry analysis. Briefly, A β peptides were separated with UPLC system (ThermoFisher) on a C18 column in an appropriate gradient. Mass spectrometry data were acquired with a Q-Exactive *plus* mass spectrometer (ThermoFisher) operating in Full Scan mode. Finally, A β fragments were identified using X calibur Quan-Browser software (version 4.1.31.9).

Immunoprecipitation

Wild-type β APP over-expressing HEK293 cells were grown in DMEM-10%SVF-penicillin/streptomycin medium. Cells were plated in six well-dishes and allowed to secrete for 8h in Optimem/SVF (1%) containing phosphoramidon (10 μ M) in order to avoid A β degradation by neprilysin (26,27), with or without the following specific inhibitors (5 μ M); pl250 for aminopeptidase M, pl302 for aminopeptidase A and p32/98 for dipeptidyl-peptidase 4. After media centrifugation, supernatants were completed with one-tenth of RIPA buffer (Tris 50 mM; pH 7.4 containing NaCl (150mM),

ethylenediaminetetraacetic acid (1mM), Triton X100 (1%), deoxycholate (0.5%), sodium dodecyl sulfate (SDS, 0,1%) and incubated overnight with a 100-fold dilution of FCA18 antibody (28) and protein A agarose beads (VWR, France). Beads were washed twice with RIPA buffer 1X, once with Tris (10mM, pH7.5) and subjected to Tris/tricine 16.5% polyacrylamide gels. Proteins were transferred onto nitro cellulose and incubated overnight with the 2H3 monoclonal antibody (anti-A β 1-12-provided by Dr. D.Schenk, San Francisco, USA) at a 1/1000 dilution. After secondary antibody incubation with a goat anti-mouse peroxidase conjugated antibody (1/2000 dilution), chemiluminescence was recorded using LAS-3000 (Raytest, Courbevoie, France) and quantifications were performed using the Multi Gauge software.

Organotypic slices preparation

Organotypic slices were prepared from P5-P7 C57bl6JRj mice (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France). Brains were quickly dissected to retrieve hippocampi then both hemispheres were sliced onto 400 μ m sections and kept into slicing medium (97.5% EBSS and 2.5% EBSS-HEPES). Slices were plated into culture medium (MEM+ Gluthamax-1 (50%), EBSS (18%), (5%) EBSS/D-glucose13%, penicillin-streptomycin (5000U/ml, 1%), horse serum (25%) and nystatin (10000U/ml, 0.06%)) and infected, 2 hours after plating, with lentiviruses coding for Green, APPwt and APPswe proteins, respectively. Slices were kept at 37°C, CO₂ (5%) for 9 days before imaging analysis.

Imaging of Spine morphology and quantitation

Spine morphology imaging was assessed on a LSM780 microscope (Zeiss, coord compagnie). Quantitation has been performed using “false” colors images Zen software with parameters as previously described (29,30).

Cytation Imaging

Mouse neuroblastoma N2a cells (kindly gifted by Dr Joëlle Chabry) were grown in DMEM SVF (10%)-penicillin/streptomycin medium. Cells were plated in 6-well plates at a density of 100 000 cells/well. Five days after infection, cells were fixed for 20min with PFA (4%), washed three times with PBS, permeabilized for 5min with Triton X100 (0.1%) and blocked for one hour with BSA (5%)/Tween (0.05%). Primary antibody against DPP4 (dilution of 1/500, Abcam) was added overnight then cells were rinsed

three times with PBS and incubated for one hour with secondary anti-Goat antibody (Interchim, d1/500 + Dapi 1/20 000). Cells were then rinsed again with PBS 1X and fixed with the Vectamount medium (Vector Laboratories) before Cytation imaging analysis. The Biotek Cytation 5 microscope automatically acquired 6 pictures per well with same acquisitions parameters (x20 magnification, numeric aperture 0.45, brightfield, at following excitation and emission wavelengths, respectively: DAPI (377; 447); GFP (469; 525); Txs Red (586; E 647). We used Image J software to quantify the fluorescence intensity TxsRed in GFP positive cells.

DPP4 activity measurements

Hippocampi were homogenized in Tris buffer (10mM, pH7.5). DPP4 activity was measured with 50µg of proteins, with or without the DPP4 inhibitor P32/98 (100µM) using Gly-Pro-7-AMC as substrate (100µM, Santa Cruz Biotech) in assay buffer (Tris 50mM, pH 7.5, a final volume of 100µl). Fluorescence was recorded at 360nm excitation and 460nm emission wavelengths as described (31).

Animals

3xTgAD mice (32) and 3xTg-WT (non-transgenic) mice were generated from breeding pairs provided by Dr. Franck LaFerla (Irvine, USA). Animals were housed with a light/dark cycle (12h:12h) and were given free access to water and food. All experimental procedures were in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and approved by the French Ministry of Higher Education and Research (Project number APAFIS#9645-2017012315473838) and by Côte d'Azur University Animal Care and Use Committee.

Viral production and stereotaxic injections

Lentiviral particles were produced as previously described {Cisse, 2017 #16581}. Viral titers were assessed using p24 ELISA (VPK-107; Cell Biolabs, San Diego, CA, USA). shRNA constructs TCATCACCGTGCCAATAGTTCTGCTGAGC (shDPP4) and GCACTACCAGAGCTAACTCAGATAGTACT (shScr) were inserted in the vector pGFP-C-sh Lenti (Cat. N°T R30023-Origene). Gene specific shRNA sequences are: TL500553 CD26 (Gene ID 13482) Mouse shRNA under the U6 promoter. Two to three-month-old wild-type and triple transgenic mice (3xTg-AD) were anesthetized by intraperitoneal injection with a mixture of ketamine (100 mg/kg) and

xylazine (10mg/kg). Mice were bilaterally stereotaxically injected into the subiculum region (3 μ l) with high titers of viral particles ($1-1.5 \times 10^{10}$ viral particles) at the following coordinates Sub: a/p: ± 3.8 , m/l ± 2.5 , d/v, -2.0 (The Mouse Brain in stereotaxic coordinates, Second Edition, Elsevier Academic Press).

***In vivo* pharmacological treatments**

A selective and specific inhibitor of DPP4, sitagliptin (provided by Sigma-aldrich-PHR1857.14) was administered once a day by intraperitoneal injections at a dose of 15mg/kg (ie 0.3mg/day for a 20g mouse) for a total of six weeks of treatment before animal sacrifices.

Barnes maze and Morris Water Maze

For Barnes maze, spatial learning and memory was studied using a dry-land based rodent procedure (33). Mice performed during three to four days on a spatial acquisition protocol allowing animals to retrieve a box placed under a hole of the Barnes Maze apparatus, before being assessed for memory with a probe trial. Mice had a total time of 60 seconds to find the target place. Several parameters were evaluated such as latency to reach the target site, number of quadrant crossing, latency and distance in the quadrant of the target site.

MWM task was assessed in a circular pool filled with an opaque solution and placed in a room surrounded by visual clues. Maze was performed as previously extensively described (34). Data were analyzed with the Animaze 6.1 Software.

Rotarod Performance and open field tests

Locomotor performance of mice was tested on a rotarod apparatus (Bioseb, model LE8200) as previously described (34). Three trials were performed during a period of 5 minutes for each animal.

Mice anxiety and exploratory behavior were recorded by an Open Field test. Briefly, time spend in the center of the box (40 x 40cm) is recorded during 10 minutes per animal.

Immunohistochemistry

Mice brains were embedded in paraffin then sliced with a microtome apparatus at a thickness of 8 μ m. Slices were treated with formic acid and then incubated

overnight at 4°C with an anti-beta amyloid 1-42 antibody (Abcam, dilution 1/1000). After several washes, sections were incubated for one hour with an anti-rabbit horseradish peroxidase. Slices were then revealed with the DAB-Immpact system (Vector Laboratories).

Human brain sample preparation

Human brain samples were obtained from the “NeuroCeb” Brain Bank. All procedures using human brain samples were performed in accordance with the ethical standards of both institutional and national research committees as well as the 1964 Helsinki declaration and amendments. In accordance with the French Bioethical Agreement (AC-2013-1887), individual consents were signed by the patients or their close relatives in their name. Cases were anonymized and informations regarding age, sex and neuropathology are provided in Table 1. Tissue lysates were obtained after mechanical homogenization of temporal cortex sections. Powder was resuspended in Tris 10mM, pH7,5 and samples were mechanically homogenized by potter, sonicated and analyzed for DPP4 enzymatic activity as described above.

Insoluble fractions preparations and A β quantitation by Elisa

Dissected hippocampi from 3xTg-WT and 3xTgAD mice were homogenized in RIPA buffer (Tris 50mM; pH 7.4 containing NaCl (150mM), ethylenediaminetetraacetic acid (1mM), Triton X100 (1%), deoxycholate (0.5%), sodium dodecyl sulfate (SDS, 0,1%) and a complete mixture of protease inhibitors) as previously described (35). Proteins were centrifuged after mechanical homogenization by potter (100 000g, 1 hour, at 4 °C). Pellets containing insoluble material were resuspended in formic acid (70%), centrifuged (100,000 x g, 1hour, 4°C), then supernatants were brought to pH 7.5 by addition of Tris-HCl (1M, pH 10.8) containing betaine (25mM). This fraction was referred to as the insoluble fraction. Human A β 40 and A β 42 peptides levels were measured in insoluble fractions using sandwich enzyme-linked immunosorbent assay kits (BioSource (Invitrogen, France) and IBL international, respectively) as described (36).

Statistical Analysis

Organotypic slices and mass spectrometry were analyzed by One-way Anova, Kruskal-Wallis (*p \leq 0.05; **p<0.01; ****p<0.005) to study the spine morphology. DPP4 activities were compared by Wilcoxon (*p \leq 0.05) and Mann-Whitney tests (*p \leq 0.05). For behavioral experiments, all statistical analyses were realized using InVivoStat

software. For each statistical analysis, normal distribution of residuals and homogeneity of variance were analyzed by checking normal probability plot and residual versus predicted plot. For Barnes Maze and MWM task, escape latency was analyzed by mixed model ANOVA with repeated measure (genotype x injection x training day) and followed by Benjamini-Hochberg's correction. Concerning statistics of probe phase MWM and Barnes Maze, Open Field and Rotarod, the influences of both injection and genotype were considered by 2-way ANOVAs (genotype and injection) with multiple comparisons adjusted by Benjamini-Hochberg's method. For open field statistical analyses, data were log-10 transformed to respect homoscedasticity assumptions. For immunohistochemistry, immunoprecipitation experiments, A β 42 positive plaques number and morphology and ELISA, we used the Mann-Whitney test. The number, area and perimeter of plaques were analyzed by automatic program and every point corresponds to average between 6 and 15 pictures for each mouse. The DPP4 activity in human was performed using two-way anova test with Dunnett's multiple comparisons test.

Results

DPP4 removes the N-terminal dipeptide of A β 40. A mass spectrometry approach.

We analyzed the capability of recombinant human dipeptidyl peptidase 4 (rhDPP4) to generate A β 3-40 from synthetic A β 40. By mass spectrometry analysis, we found that DPP4 converts A β 1-40 synthetic peptide into A β 3-40, i.e releases the N-terminal dipeptide of A β 40 (**Figure 1A,B**). The A β 3-40/ A β 1-40 ratio increased with time and was prevented by the DPP4 specific inhibitor p32/98 (37) (**Figure 1C,D**).

Pharmacological blockade of DPP4 potentiates A β full-length recovery in cells

Thanks to antibodies that interact only with the free N-terminal aspartyl residue of A β (FCA18, (28)), we previously established that APA inhibitors potentiate the recovery of full-length A β (flA β) generated by human cells overexpressing the Swedish-mutated form of APP (APP^{swe}, (14)). Here we show as a control that, as expected, flA β recovery was highly enhanced by neprilysin (**Figure 2**), one of the main A β -degrading enzyme (27,38). Further, we assessed the potential effect of the aminopeptidase M, PL250, (39), aminopeptidase A, PL302 (40) and DPP4, P32/98 inhibitors (37). PL302 and P32/98 but not PL250 significantly potentiated the recovery of flA β (**Figure 2**). Further, we observed an additive effect of PL302 and P32/98

(**Figure 2**). These data indicate that aminopeptidases A and DPP4 but not aminopeptidase M contribute to the N-terminal truncation of $\text{flA}\beta$ and that these catalytic events are likely independent.

DPP4 blockade improves dendritic spines morphology

In order to evaluate the putative impact of DPP4 on dendritic alterations, we examined spines morphology of hippocampal organotypic slices infected with lentiviruses bearing either Wild-type APP (APPwt) or APP^{swe} and Green constructs (see expression in **Figure 3A**). The spines morphology was classified within three categories: mature (mushroom/thin, **Figure 3B**, red bars), stubby (**Figure 3B**, yellow bars) and immature spines (filopodia, **Figure 3B**, green bars). APP^{swe}-expressing slices show lower mature spines than APPwt and a concomitant increase of filopodia (compare APPwt NT and APP^{swe} NT conditions in **Figure 3B**). Of importance, the morphological alterations observed in APP^{swe}-expressing slices were fully rescued by pretreatment with the highly potent and selective DPP4 inhibitor sitagliptin (41), **Figure 3A,B**). Overall, this set of data indicates that DPP4 contributes to the morphological alterations affecting spines in an AD model.

Genetic reduction and pharmacological blockade of DPP4 reduce pE3-42A β and A β plaques load.

We attempted to reduce DPP4 expression and activity by shRNA approach. We designed several shRNA probes that were examined for their ability to lower DPP4 expression and activity in N2a cells. Among them, one sequence (see methods) was selected since its transfection reduced the number of DPP4-positive N2a cells (**Supplementary Figure 1A,B**) by about 30%. Then, we produced lentiviruses harboring the shRNA coupled with GFP. This allowed to confirm that stereotaxical delivery of shRNAs adequately yielded expression in the subiculum of the hippocampus of mice brains (**Supplementary Figure 1C**). shRNA DPP4 infection triggers an about 25% reduction of DPP4 activity in WT mice brain (**Supplementary Figure 1D,E**).

We have examined the biochemical and anatomical impacts of DPP4 gene reduction in 3xTgAD mice infected or not at 3 months-old with lentiviruses expressing either the above-selected shRNA DPP4 or shRNA Scramble (shRNAScr). At 12 month-old, DPP4 downregulation drastically reduces the number of A β ₄₂-positive

plaques (**Figure 4A,B**) without affecting their mean perimeter (**Figure 4C**) and areas (**Figure 4D**). Accordingly, as expected at this age, A β 40 and A β 42 recoveries were highly enhanced in the insoluble fraction prepared from shRNAScr-infected 3xTg-AD vs WT mice shRNA thought to reflect A β aggregated state. However, both A β species were drastically lowered upon shRNA DPP4 infection (compare light and dark green bars in **Figure 5A,B**).

We attempted to examine the influence of chronic treatment of sitagliptin. This was performed at an earlier age, when A β 42-positive plaques are clearly less numerous than at 12 month-old. Thus the quantification of the number of plaques was more difficult and suffers from higher randomness. Nevertheless, although it did not reach statistical significance, we observed of a clear reduction of A β 42 positives plaques (**Figure 6A,B**) but not mean area (**Figure 6C**) and perimeter (**Figure 6D**). In agreement with a genuine reduction of plaques, A β 42 was recovered in lower amount in the insoluble fraction prepared from sitagliptin-treated 3xTg-AD mice (**Figure 7A,B**). Altogether, our combined genetic and pharmacological approaches indicate that DPP4 down-regulation lowers A β -positive plaques formation and A β aggregation in 3xTg-AD mice.

Genetic and pharmacological reduction of DPP4 partly alleviate learning and memory defects in 3xTg-AD mice.

To determine whether DPP4 activity could modulate memory and learning *in vivo*, we used the 3xTgAD mouse model that gathers several hallmarks of AD pathology ie senile plaques, neurofibrillary tangles, memory deficit and synaptic plasticity defects (32). We used two well-known spatial learning tests, the Morris Water Maze (MWM) and Barnes Maze, that are considered as sensitive means to detect memory deficits in these mice (42), to examine the influence of genetic and pharmacological reduction of DPP4 activity. As expected, 3xTg-AD mice were affected in their ability to reach the platform as reflected by a higher latency to reach the platform than WT mice in the MWM (**Figure 8A**). Interestingly, shRNADPP4 partly rescues these alterations (**Figure 8A**). This is further supported by the randomness in the trajectories of shScr-treated 3xTg-AD mice (**Figure 8B**, upper right) that was corrected in shRNADPP4-treated mice in probe tests performed at 48h where treated mice swim in the adequate NW zone virtually similarly to Wt mice (**Figure 8B**, lower right). Of

note, chronic treatment with sitagliptin indicated that pharmacological blockade of DPP4 also partly rescued the latency to reach the platform in the Barnes test, a paradigm that was drastically altered in Scr-treated 3xTg-AD mice (**Supplementary Figure 2A**). Accordingly, sitagliptin partly improved the gaussian distribution of the representation of the number of entries in every hole in Sitagliptin-treated 3x-TgAD mice (**Supplementary Figure 2B**). Of importance, neither sitagliptin (**Supplementary Figure 3**) nor shRNADPP4 (data not shown) affect locomotor activity or anxiety parameters as measured by the rotarod and open field test.

DPP4 activity is increased in brains of AD patients.

It has already been described that pE3-42A β is present in abundance in brains of sporadic and familial AD patients (43). If so, we assume that there should be an enhanced activity of DPP4 in AD-affected brains. Here, we compared DPP4 activity in hippocampi of controls and patients suffering from sporadic AD (see Table 2). We observed a higher inhibitor-sensitive DPP4 activity in AD brains than in control patients. This increase appears to be AD Braak stage-dependent and culminated at Braak stages I-III then declined to return to control values at later stages (**Figure 9**).

Discussion

The main conclusion of our study is that the reduction of DPP4 could be beneficial in the context of AD. It is supported by five lines of independent *in vitro* and *in vivo* evidence. First, recombinant DPP4 releases the N-terminal dipeptide of synthetic A β ; Second, inhibition of DPP4 in human cells potentiates the recovery of secreted full-length A β ; Third, in APP^{swe}-expressing cells that display drastic alterations of dendritic spines morphology, pharmacological blockade of DPP4 fully restores a normal phenotype; Fourth, both shRNA and inhibitor approaches drastically reduce A β ₄₂-positive plaques and A β _{40/42} load in insoluble fractions prepared from 3xTg-AD brains; Fifth, shDPP4 and sitagliptin partly rescue learning and memory deficits. Overall, this consistent network of evidence strongly suggests that DPP4 could contribute to the generation of E3-A β in AD. It should be noted that DPP4 was documented as the rate-limiting enzyme yielding E3-A β amenable to cyclisation by glutaminy cyclase. These concerted enzymatic events have been previously documented *in vitro* (23).

DPP4 inhibitors have been proposed as means to interfere with cognitive disorders (25). Most of studies deal with Type 2 diabetes, a well-recognized risk factor for cognitive dysfunctions and dementia (44). This is mainly due to the propensity of DPP4 to hydrolyze many substrates {Kosaraju, 2017 #17460} including GLP-1 (45,46). GLP-1 is a 30 amino-acid peptide which harbors an His-Ala N-terminal dipeptide that fulfils the requirement of DPP4 specificity. Indeed, GLP-1 is one of the preferred substrates of DPP4 (47). Interestingly, although GLP-1 is mainly produced in the intestinal tract, it is also present in the brain and more particularly, in the hippocampus and frontal cortex (48). Of note, GLP-1 expression is decreased in AD brain as well as in AD mouse model (46). Further, it has been shown that GLP-1 overexpression triggers protective effects and that its DPP4-mediated proteolysis drastically shortens its lifetime (45,46). Accordingly, DPP4 inhibition favors GLP-1 signaling and improves AD-like cognitive deficits in several AD mouse models (45,46) including the 3xTg-AD mice (46). Our data indicate that, besides GLP-1, DPP4 could also participate to AD pathology by targeting A β .

In AD mice models, several anatomical and functional paradigms including apathy-like phenotype, LTP perturbation and endolysosomal dysfunction (9,49,50) have been shown to occur early and independently of A β (7,34) and, for some of them, are drastically potentiated by γ -secretase inhibitors (7). Recent evidence indicates that the β -secretase-derived fragment of APP (namely C99) could account for these dysfunctions. However, at late stage of AD-like pathology, an A β -linked contribution to learning and memory defects was observed. The firm demonstration of this A β -linked counterpart was brought by the comparison of 3xTg-AD and 2xTg-AD mice (34). The latter mice display similar accumulation of C99 but, unlike 3xTg-AD, they never produce detectable amounts of A β (due to the absence of PS1 mutation (34)). Of note, although 3xTg-AD and 2xTg-AD mice display similar early perturbations, the former mice exhibit higher learning and memory defects. Our data indicate that this A β -linked alterations of behavior could be accounted for by pE3-A β peptides. Of importance, we show that both genetic reduction and pharmacological blockade of DPP4 drastically reduce A β 42-positive plaques and A β 42 recovery. This is likely due to the reduction of pE3-A β . Thus, it has been shown that very low amounts of pE3-42A β are sufficient to serve as A β 42 seed (51), accelerate its aggregation (23) and thereby, the occurrence of plaques.

It should be emphasized that cognitive alterations are not fully rescued by genetic or pharmacological down-regulation of DPP4. This could be explained by the fact that shRNA DPP4 triggers only a partial reduction of the enzyme activity (**see supplementary Figure 1**) but not by a poor sitagliptin bioavailability after gavage administration (52). Another likely possibility is that besides DPP4, other activities involved in A β truncation could occur. One such candidate could be the exopeptidase aminopeptidase A. Thus, this enzyme displays a high affinity for acidic residues such as the N-terminal aspartyl residue of A β (22). This hypothesis is supported by our previous study (and present Figure 2) showing that APA inhibitors enhanced the recovery of cellular full-length A β . Interestingly, APA- and DPP4- inhibitors-induced potentiation of full-length A β recovery was additive, indicating that the two enzymes independently target full-length A β . Thus, the shRNA DPP4-resistant cognitive alterations could be due to residual bioactive DPP4 and APA. It should be noted that we have recently shown that the modulation of APA *in vivo* partly alleviates memory deficits in 3xTg-AD mice (data not shown).

DPP4 is increased in sporadic AD-affected brain but this increase occurs relatively early at Braak stages I-III and returned to virtually control values at later stages. This data agrees well with previous studies showing that DPP4 is up-regulated in AD brain neurons and is associated with plaques (53). The increase of DPP4 indeed coincides with the appearance of plaques (our unpublished data), and hence, one can envision that the pE3-A β generated could well initiate the seeding of A β , its aggregation and the occurrence of plaques. This fits well with the observation that only that very low amounts of pE3-42A β could serve as a seed of A β 42 aggregation and deposition (51) and that low amounts of pE3-42A β are sufficient to induce hippocampal neurodegeneration in transgenic mice (54). Thus, DPP4 transient increase could be sufficient to initiate a vicious cycle by which AD anatomical lesions progress.

Footnotes

We wish to thank Dr. La Ferla for his initial supply of 3xTg-AD mice. This work was supported through the LABEX (excellence laboratory, program 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. The authors greatly thank Frédéric Brau and

Sophie Abelanet at Imaging and Cytometry platform (Côte d'Azur, MICA). The authors thank Dr Luc Buée (UMR 837 Inserm-UJDSL-CHRU, Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert, Lille) for helpful discussions.

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

The abbreviations used are:

AD: Alzheimer's Disease

APA : Aminopeptidase A

APP : Amyloid Precursor Protein

A β : Amyloid- β

DPP4 : Dipeptidyl peptidase 4

LTP: Long-term potentiation

N2a : Neuroblastoma2a cells

shRNA: short hairpin Ribonucleic acid

References

1. Hardy, J. A., and Higgins, G. A. (1992) Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* **256**, 184-185
2. Checler, F. (1995) Processing of the b-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **65**, 1431-1444
3. Panza, F., Lozupone, M., Logroscino, G., and Imbimbo, B. P. (2019) A critical appraisal of amyloid-beta-targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* **15**, 73-88
4. Huang, Y. M., Shen, J., and Zhao, H. L. (2019) Major Clinical Trials Failed the Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease. *J Am Geriatr Soc* **67**, 841-844
5. Herrup, K. (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* **18**, 794-799
6. Pulina, M. V., Hopkins, M., Haroutunian, V., Greengard, P., and Bustos, V. (2020) C99 selectively accumulates in vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association* **16**, 273-282
7. Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Pagnotta, S., Biferi, M. G., Barkats, M., Lacor, P., Klein, W., Bauer, C., and Checler, F. (2016) Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol* **132**, 257-276
8. Cavanagh, C., Colby-Milley, J., Bouvier, D., Farso, M., Chabot, J. G., Quirion, R., and Krantic, S. (2013) 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**, 233-238
9. Mondragon-Rodriguez, S., Gu, N., Manseau, F., and 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
10. Kaur, G., Pawlik, M., Gandy, S. E., Ehrlich, M. E., Smiley, J. F., and Levy, E. (2017) 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
11. Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bourgeois, A., Becot, A., and Checler, F. (2019) Does Intraneuronal Accumulation of Carboxyl-terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease? *Curr Alzheimer Res* **16**, 453-457

12. Shoji, M., Golde, T. E., Ghiso, J., Cheung, T. T., Estus, S., Shaffer, M., Cai, X. D., McKay, D. M., Tintner, R., Frangione, B., and Younkin, S. G. (1992) Production of the Alzheimer amyloid b protein by normal proteolytic processing. *Science* **258**, 126-129
13. Haass, C., Hung, A. Y., Schlossmacher, M. G., Oltersdorf, T., Teplow, D. B., and Selkoe, D. J. (1993) Normal cellular processing of the b-amyloid precursor protein results in the secretion of the amyloid b peptide and related molecules. *Nature* **695**, 109-116
14. Sevalle, J., Amoyel, A., Robert, P., Fournie-Zaluski, M. C., Roques, B., and Checler, F. (2009) Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem* **109**, 248-256
15. Castellani, R. J., Lee, H. G., Perry, G., and Smith, M. A. (2006) Antioxidant protection and neurodegenerative disease: the role of amyloid-beta and tau. *Am J Alzheimers Dis Other Demen* **21**, 126-130
16. Brothers, H. M., Gosztyla, M. L., and Robinson, S. R. (2018) The Physiological Roles of Amyloid-beta Peptide Hint at New Ways to Treat Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci* **10**, 118
17. Dunys, J., Valverde, A., and Checler, F. (2018) Are N- and C-terminally truncated Abeta species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *J Biol Chem* **293**, 15419-15428
18. Schilling, S., Zeitschel, U., Hoffmann, T., Heiser, U., Francke, M., Kehlen, A., Holzer, M., Hutter-Paier, B., Prokesch, M., Windisch, M., Jagla, W., Schlenzig, D., Lindner, C., Rudolph, T., Reuter, G., Cynis, H., Montag, D., Demuth, H. U., and Rossner, S. (2008) Glutaminyl cyclase inhibition attenuates pyroglutamate Abeta and Alzheimer's disease-like pathology. *Nat Med* **14**, 1106-1111
19. Cynis, H., Scheel, E., Saido, T. C., Schilling, S., and Demuth, H. U. (2008) Amyloidogenic Processing of Amyloid Precursor Protein: Evidence of a Pivotal Role of Glutaminyl Cyclase in Generation of Pyroglutamate-Modified Amyloid-beta. *Biochemistry*
20. Jawhar, S., Wirths, O., Schilling, S., Graubner, S., Demuth, H. U., and Bayer, T. A. (2011) Overexpression of glutaminyl cyclase, the enzyme responsible for pyroglutamate A{beta} formation, induces behavioral deficits, and glutaminyl cyclase knock-out rescues the behavioral phenotype in 5XFAD mice. *J Biol Chem* **286**, 4454-4460
21. Rahfeld, J., Schutkowski, M., Faust, J., Neubert, K., Barth, A., and Heins, J. (1991) Extended investigation of the substrate specificity of dipeptidyl peptidase IV from pig kidney. *Biol Chem Hoppe Seyler* **372**, 313-318
22. Checler, F. (1993) Neuropeptide-degrading peptidases. in *Methods in neurotransmitters and neuropeptides research. Part 2.* (Nagatsu, T., Parvez, H., Naoi, M., and Parvez, S. eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp 375-418
23. Antonyan, A., Schlenzig, D., Schilling, S., Naumann, M., Sharoyan, S., Mardanyan, S., and Demuth, H. U. (2018) Concerted action of dipeptidyl peptidase IV and glutaminyl cyclase results in formation of pyroglutamate-modified amyloid peptides in vitro. *Neurochem Int* **113**, 112-119
24. Angelopoulou, E., and Piperi, C. (2018) DPP-4 inhibitors: a promising therapeutic approach against Alzheimer's disease. *Ann Transl Med* **6**, 255
25. Cheng, Q., Cheng, J., Cordato, D., and Gao, J. (2020) Can dipeptidyl peptidase-4 inhibitors treat cognitive disorders? *Pharmacol Ther* **212**, 107559
26. Miners, J. S., Barua, N., Kehoe, P. G., Gill, S., and Love, S. (2011) Abeta-degrading enzymes: potential for treatment of Alzheimer disease. *J Neuropathol Exp Neurol* **70**, 944-959
27. Nalivaeva, N. N., Belyaev, N. D., Zhuravin, I. A., and Turner, A. J. (2012) The Alzheimer's amyloid-degrading peptidase, neprilysin: can we control it? *Int J Alzheimers Dis* **2012**, 383796
28. Barelli, H., Lebeau, A., Vizzavona, J., Delaere, P., Chevallier, N., Drouot, C., Marambaud, P., Ancolio, K., Buxbaum, J. D., Khorkova, O., Heroux, J., Sahasrabudhe, S., Martinez, J., Warter, J.-M., Mohr, M., and Checler, F. (1997) Characterization of new polyclonal antibodies specific for 40 and 42 aminoacid-long amyloid b peptides: their use to examine the cell biology of

- presenilins and the immunohistochemistry of sporadic Alzheimer's disease and cerebral amyloid angiopathy cases. *Mol. Medicine* **3**, 695-707
29. Risher, W. C., Patel, S., Kim, I. H., Uezu, A., Bhagat, S., Wilton, D. K., Pilaz, L. J., Singh Alvarado, J., Calhan, O. Y., Silver, D. L., Stevens, B., Calakos, N., Soderling, S. H., and Eroglu, C. (2014) Astrocytes refine cortical connectivity at dendritic spines. *Elife* **3**
 30. Qiao, H., Li, M. X., Xu, C., Chen, H. B., An, S. C., and Ma, X. M. (2016) Dendritic Spines in Depression: What We Learned from Animal Models. *Neural Plast* **2016**, 8056370
 31. Ichai, C., Chevallier, N., Delaere, P., Dournaud, P., Epelbaum, J., Hauw, J. J., Vincent, J. P., and Checler, F. (1994) Influence of region-specific alterations of neuropeptidases content on the catabolic fates of neuropeptides in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **62**, 645-655
 32. Oddo, S., Caccamo, A., Shepherd, J. D., Murphy, G., Golde, T. E., Kaye, R., Metherate, R., Mattson, M. P., Akbari, Y., and LaFerla, F. (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular Ab and synaptic dysfunction. *Neuron* **39**, 409-421
 33. Lena, I., and Mantegazza, M. (2019) Nav1.2 haploinsufficiency in Scn2a knock-out mice causes an autistic-like phenotype attenuated with age. *Sci Rep* **9**, 12886
 34. Bourgeois, A., Lauritzen, I., Lorivel, T., Bauer, C., Checler, F., and 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
 35. Pardossi-Piquard, R., Lauritzen, I., Bauer, C., Sacco, G., Robert, P., and Checler, F. (2016) Influence of Genetic Background on Apathy-Like Behavior in Triple Transgenic AD Mice. *Curr Alzheimer Res* **13**, 942-949
 36. Lauritzen, I., Pardossi-Piquard, R., Bauer, C., Brigham, E., Abraham, J. D., Ranaldi, S., Fraser, P., St-George-Hyslop, P., Le Thuc, O., Espin, V., Chami, L., Dunys, J., and Checler, F. (2012) The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci* **32**, 16243-11655a
 37. Pospisilik, J. A., Stafford, S. G., Demuth, H. U., Brownsey, R., Parkhouse, W., Finegood, D. T., McIntosh, C. H., and Pederson, R. A. (2002) Long-term treatment with the dipeptidyl peptidase IV inhibitor P32/98 causes sustained improvements in glucose tolerance, insulin sensitivity, hyperinsulinemia, and beta-cell glucose responsiveness in VDF (fa/fa) Zucker rats. *Diabetes* **51**, 943-950
 38. Miners, J. S., Baig, S., Palmer, J., Palmer, L. E., Kehoe, P. G., and Love, S. (2008) A β -degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol* **18**, 240-252
 39. Chen, H., Roques, B. P., and Fournie-Zaluski, M. C. (1999) Design of the first highly potent and selective aminopeptidase N (EC 3.4.11.2) inhibitor. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **9**, 1511-1516
 40. David, C., Bischoff, L., Meudal, H., Mothe, A., De Mota, N., DaNascimento, S., Llorens-Cortes, C., Fournie-Zaluski, M. C., and Roques, B. P. (1999) Investigation of subsite preferences in aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) led to the design of the first highly potent and selective inhibitors of this enzyme. *J Med Chem* **42**, 5197-5211
 41. Green, B. D., Flatt, P. R., and Bailey, C. J. (2006) Dipeptidyl peptidase IV (DPP IV) inhibitors: A newly emerging drug class for the treatment of type 2 diabetes. *Diab Vasc Dis Res* **3**, 159-165
 42. Stover, K. R., Campbell, M. A., Van Winssen, C. M., and Brown, R. E. (2015) Early detection of cognitive deficits in the 3xTg-AD mouse model of Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* **289**, 29-38
 43. Portelius, E., Andreasson, U., Ringman, J. M., Buerger, K., Daborg, J., Buchhave, P., Hansson, O., Harmsen, A., Gustavsson, M. K., Hanse, E., Galasko, D., Hampel, H., Blennow, K., and Zetterberg, H. (2010) Distinct cerebrospinal fluid amyloid beta peptide signatures in sporadic and PSEN1 A431E-associated familial Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener* **5**, 2
 44. Yuan, X. Y., and Wang, X. G. (2017) Mild cognitive impairment in type 2 diabetes mellitus and related risk factors: a review. *Rev Neurosci* **28**, 715-723

45. D'Amico, M., Di Filippo, C., Marfella, R., Abbatecola, A. M., Ferraraccio, F., Rossi, F., and Paolisso, G. (2010) Long-term inhibition of dipeptidyl peptidase-4 in Alzheimer's prone mice. *Exp Gerontol* **45**, 202-207
46. Chen, S., Zhou, M., Sun, J., Guo, A., Fernando, R. L., Chen, Y., Peng, P., Zhao, G., and Deng, Y. (2019) DPP-4 inhibitor improves learning and memory deficits and AD-like neurodegeneration by modulating the GLP-1 signaling. *Neuropharmacology* **157**, 107668
47. Gilbert, M. P., and Pratley, R. E. (2020) GLP-1 Analogs and DPP-4 Inhibitors in Type 2 Diabetes Therapy: Review of Head-to-Head Clinical Trials. *Front Endocrinol (Lausanne)* **11**, 178
48. Kim, D. S., Choi, H. I., Wang, Y., Luo, Y., Hoffer, B. J., and Greig, N. H. (2017) A New Treatment Strategy for Parkinson's Disease through the Gut-Brain Axis: The Glucagon-Like Peptide-1 Receptor Pathway. *Cell Transplant* **26**, 1560-1571
49. Nixon, R. A. (2017) Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J* **31**, 2729-2743
50. Goutagny, R., Gu, N., Cavanagh, C., Jackson, J., Chabot, J. G., Quirion, R., Krantic, S., and 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
51. Wittnam, J. L., Portelius, E., Zetterberg, H., Gustavsson, M. K., Schilling, S., Koch, B., Demuth, H. U., Blennow, K., Wirths, O., and Bayer, T. A. (2012) Pyroglutamate amyloid beta (Aβ) aggravates behavioral deficits in transgenic amyloid mouse model for Alzheimer disease. *J Biol Chem* **287**, 8154-8162
52. Bergman, A., Ebel, D., Liu, F., Stone, J., Wang, A., Zeng, W., Chen, L., Dilzer, S., Lasseter, K., Herman, G., Wagner, J., and Krishna, R. (2007) Absolute bioavailability of sitagliptin, an oral dipeptidyl peptidase-4 inhibitor, in healthy volunteers. *Biopharm Drug Dispos* **28**, 315-322
53. Bernstein, H. G., Dobrowolny, H., Keilhoff, G., and Steiner, J. (2018) Dipeptidyl peptidase IV, which probably plays important roles in Alzheimer disease (AD) pathology, is upregulated in AD brain neurons and associates with amyloid plaques. *Neurochem Int* **114**, 55-57
54. Alexandru, A., Jagla, W., Graubner, S., Becker, A., Bauscher, C., Kohlmann, S., Sedlmeier, R., Raber, K. A., Cynis, H., Ronicke, R., Reymann, K. G., Petrasch-Parwez, E., Hartlage-Rubsamen, M., Waniek, A., Rossner, S., Schilling, S., Osmand, A. P., Demuth, H. U., and von Horsten, S. (2011) Selective hippocampal neurodegeneration in transgenic mice expressing small amounts of truncated Aβ is induced by pyroglutamate-Aβ formation. *J Neurosci* **31**, 12790-12801

Figures Legends

Fig. 1. DPP4 releases the N-terminal dipeptide of Aβ40. HPLC chromatograms of Aβ1-40 (**A**) and Aβ3-40 (**B**) peptides and their spectral deconvolution revealing m/z values (4327.1515 and 4141.0908 respectively) after a 8 hours incubation of human recombinant DPP4 with synthetic Aβ. **C:** Aβ3-40/Aβ1-40 ratio is represented over time in presence or absence of rhDPP4, with or without p32/98 inhibitor. **D:** quantitation of Aβ3-40/Aβ1-40 ratio observed as in **C**. values are means +/- S.E.M. of 5-6 determinations. (**p<0.01; one-way ANOVA with Dunn's multiple comparisons post-test).

Fig.2. Effects of pharmacological modulation of endogenous DPP4 in HEK APPwt cells on full-length A β expression. **A:** Full-length A β immunoreactivity in HEK APPwt cells treated without or with either phosphoramidon (PA), PL302, PL250 and P32/98 (aminopeptidase A, M and DPP4 inhibitors, respectively). **B:** densitometric quantitation of A β immunoreactivity. Values are expressed as percent of untreated cells (taken as 100) and are the means \pm S.E.M. of 6 to 17 determinations; * p <0.05, **** p <0.0001 (Mann-Whitney test).

Fig.3. DPP4 pharmacological blockade influences synaptic morphology. **A** illustrates an organotypic slice infected with Green lentivirus as described in the methods. Original (black pictures) and false color (blue colors) representations show dendrites from organotypic slices infected with lentivirus expressing APP_{swe} treated or not with sitagliptin. **B** represents the percentage of spines corresponding to mushroom (red bar), stubby (yellow bar) and immature (filopodia, green bars) categories and are the means \pm S.E.M of 10-22 determinations. * p <0.05, *** p <0.005, ns, not statistically significant (Kruskal-Wallis test with Dunn's multiple comparisons post-test).

Fig.4. A β 42 positive plaques are decreased in 3xTgAD mice brain after shRNA-mediated reduction of endogenous DPP4. **A:** Immunohistochemical analysis using anti-A β 42 antibody in twelve-month-old 3xTgAD mice infected with lentiviruses bearing either shScr or shDPP4. **B.** Graph represents the number of A β 42 positive plaques per square millimeters. **C,D** represents mean perimeter (**C**) and area (**D**) of A β 42-positive plaques. **B-D**, Data are means \pm SEM of 5 (shScr) or 7 (shDPP4) (Mann-Whitney test). * p <0.05, ns, not statistically significant

Fig.5. A β 40 and A β 42 levels are reduced in shDPP4-treated 3xTg-AD mice. A β 40 (**A**) and A β 42 (**B**) measured by ELISA in insoluble fractions prepared from 12 month-old 3xTgWT and 3xTgAD transgenic mice infected with lentiviruses bearing either shScr or shDPP4. Values are means \pm SEM of 6 (WTshScr and WtshDPP4) or 15 (3xTg-AD shScr and 3xTg-AD shDPP4) determinations and are expressed in pg per mg of tissue. **** p <0.0001 (Mann-Whitney test).

Fig.6. Influence of sitagliptin on A β 42 positive plaques. **A**, Immunohistochemical analysis using anti-A β 42 antibody in 10-11-month-old 3xTgAD mice chronically treated or not with sitagliptin. **B**. Graph represents the number of A β 42 positive plaques per square millimeters. **C,D** represents mean area (**C**) and perimeter (**D**) of A β 42-positive plaques. **B-D**, Data are means \pm SEM of 6 (Control, physiological serum) or 8 (sitagliptin) (Mann-Whitney test). Note that although there is a clear apparent reduction of the number of A β 42-positive plaques, statistical analysis did not reach significance. ns, not statistically significant (Mann-Whitney test).

Fig.7. A β 40 and A β 42 levels are reduced in sitagliptin-treated 3xTg-AD mice. A β 40 (**A**) and A β 42 (**B**) measured by ELISA in insoluble fractions prepared from 10-11-month-old 3xTgWT and 3xTgAD transgenic mice chronically treated with sitagliptin. Values are means of 4 (WT serum and WT sitagliptin) or 15 (3xTg-AD serum and 3xTg-AD sitagliptin) determinations and are expressed in pg per mg of proteins. * $p < 0.05$, ns, not statistically significant (Mann-Whitney test).

Fig.8. shDPP4 treatment partly restores learning and memory deficits in 3xTgAD mice model. **A**, Graphical representation of the latency to reach the platform in Morris Water Maze for 3xTgWT (light green and red curves) and 3xTgAD (dark green and red curves) mice infected with lentiviruses expressing shScr (light and dark red curves) or shDPP4 (light and dark green curves). **B**, swimming trajectories of indicated treated mice. **C** shows the number of entries in each quadrant of the Morris Water Maze. (NW: North West, SW: South West, NE: North East, SE: South East.). (WT shScr: $n=11$; WT shDPP4: $n=12$; 3xTgAD shScr: $n=9$; 3xTgAD shDPP4: $n=11$. * $p < 0.05$; *** $p < 0.005$ (Invivostat test).

Fig.9. DPP4 enzymatic activity is transiently increased in sporadic AD-affected brains. DPP4 enzymatic activity was measured by fluorimetry as described in the Methods human brain samples from different Braak stages patients (see Table 1) (controls: $n=10$; AD I-III: $n=3$; AD IV-V, $n=4$; AD VI: $n=9$; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.0005$. (2-way Anova test with Dunnett's multiples comparisons test).

Supplementary Figures:

Supplementary Figure 1: shRNA dependent modulation of endogenous DPP4 expression and activity in N2a cells and in infected mouse brain. **A:** Cytation imaging of N2a cells transduced with lentiviruses bearing shRNA DPP4) or shRNA Scr. Representative images of immunofluorescence for DPP4, GFP (shRNAs) and Dapi staining (nuclei). **B:** Quantitation of DPP4-positive N2a cells visualized using cytation imaging. n=158 for shScr and n=311 for shDPP4; **p<0.005 (Mann Whitney test). **C:** Pictures of mouse brain slices showing shRNA diffusion and distribution (GFP staining) one month after stereotaxic injection for 3xTgWT mice infected with shScr or shDPP4. **D,E:** DPP4 enzymatic activity was measured as described in Methods in dissected hippocampi of infected mice (n=8-10, *p<0.05 (Wilcoxon and Mann-Whitney tests).

Supplementary Figure 2. Sitagliptin influence on Barnes Maze tests. **A** shows the latency to reach the target hole for 3xTgWT (light green and red curves) and 3xTgAD (dark green and red curves) mice (10-11 month-old) chronically treated with physiological serum (light and dark red curves) or sitagliptin (15mg/kg, light and dark green curves) (see Methods). Graph in B shows number of entries in every hole for 8-10 animals. (genotype difference between 3xTgAD and WT in learning curve and in number of entries in target hole of Barnes Maze test: ***p<0.005 **** p<0.0001, Invivostat test).

Supplementary Figure 3: Sitagliptin does not affect locomotor activity and anxiety. WT and 3xTgAD (AD) transgenic mice chronically treated with serum or sitagliptin as described in methods were tested for their locomotor activity and anxiety by the rotarod (A) and open field (B) tests, respectively.

	Age (years)	Gender	PMD (h)	Braak's NFT stage [#]
Brain samples used in enzymatic activities				
Control	71	Male	26	-
Control	84	Male	32	-
Control	71	Female	15	-
Control	60	Female	28	-
Control	89	Female	12	-
Control	52	Female	29	-
Control	61	Male	20	-
ALS	62	Female	44	-
ALS	55	Male	21	-
ALS	62	Female	21	-
AD	68	Female	51	I-II
AD	68	Female	10	I-II
AD	92	Female	NA	III
AD	70	Male	31	III
AD	81	Female	60	IV
AD	80	Female	51	V
AD	80	Male	23	V
AD	65	Male	70	V
AD	84	Female	81	V
AD	78	Female	18	VI
AD	81	Male	19	VI
AD	65	Female	41	VI
AD	89	Female	26	VI
AD	91	Female	34	VI
AD	55	Female	58	VI
AD	75	Female	7	VI
AD	81	Female	NA	VI
AD	82	Female	NA	VI

Table 1: Characterization of the sporadic AD cohort. PMD: Post mortem delay, h: hours, NA: not available. Controls are brain samples isolated from post-mortem patients diagnosed as negative for several neuropathologies. Control brains are samples diagnosed with Amyotrophic lateral sclerosis that were negative for AD pathology. [#] Braak and Braak's NFT stage, (-) means no NFT detection.

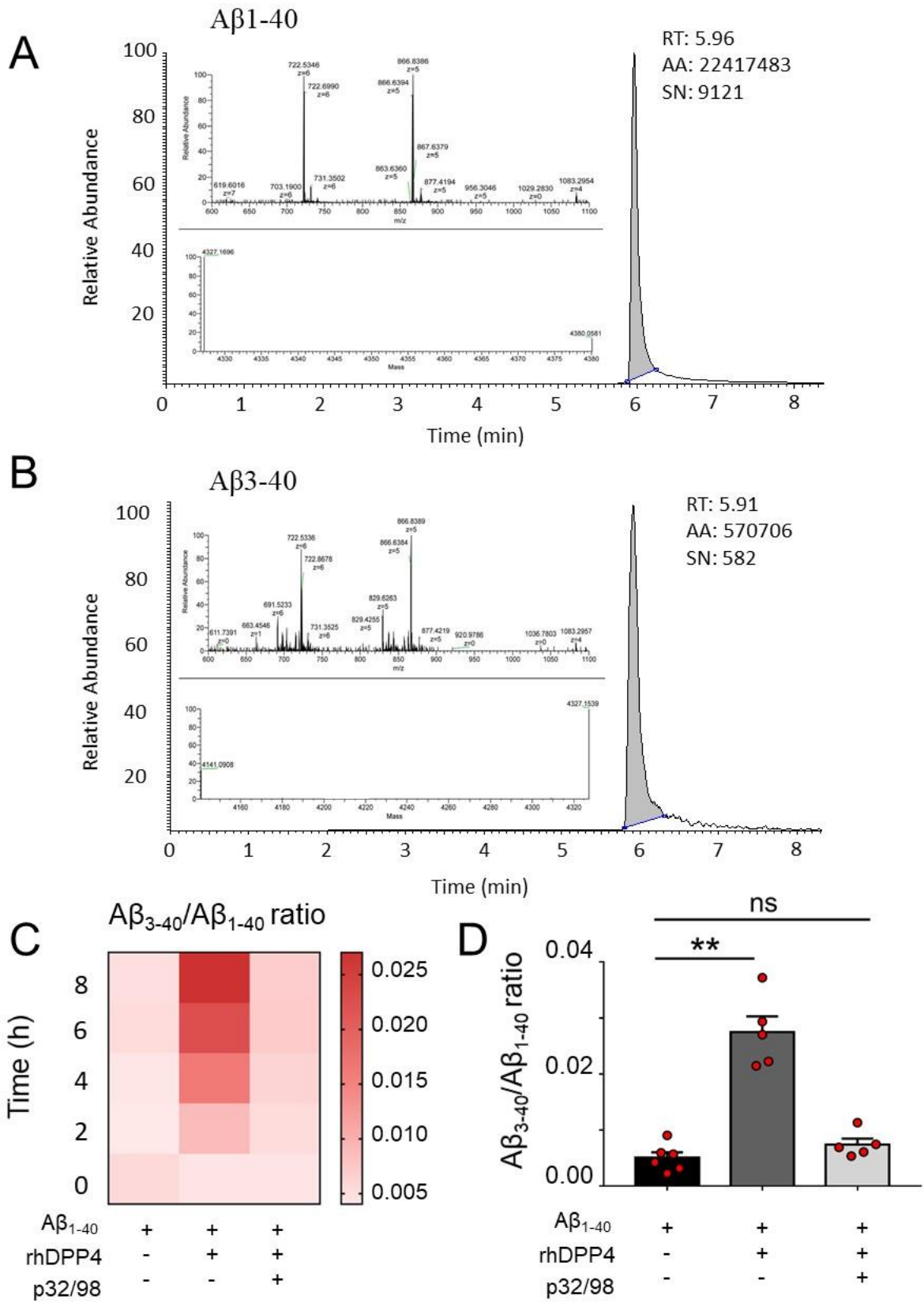


Figure 1. Valverde et al.

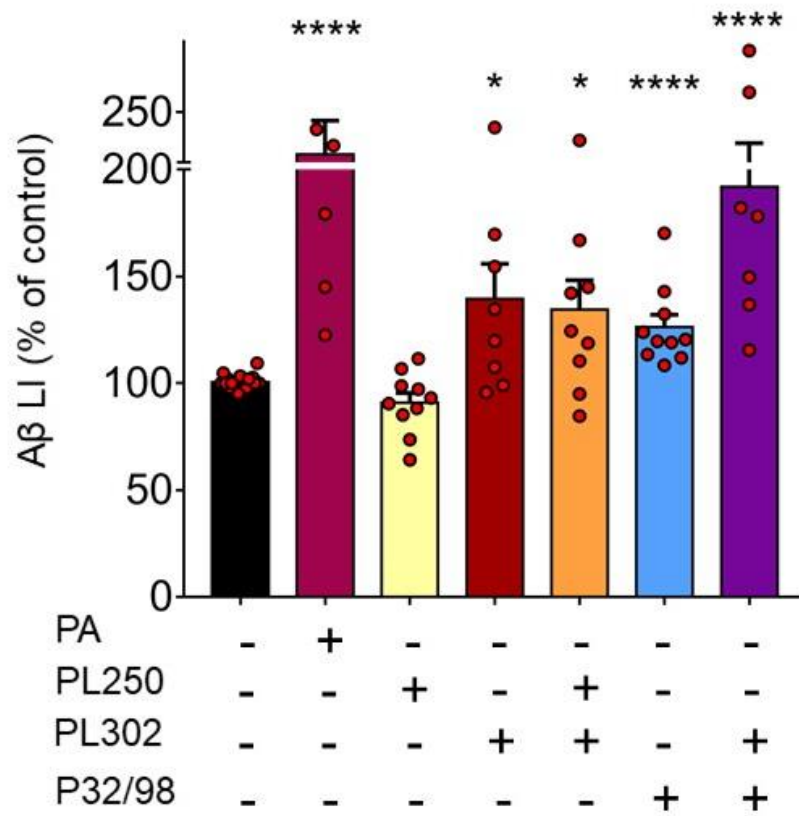
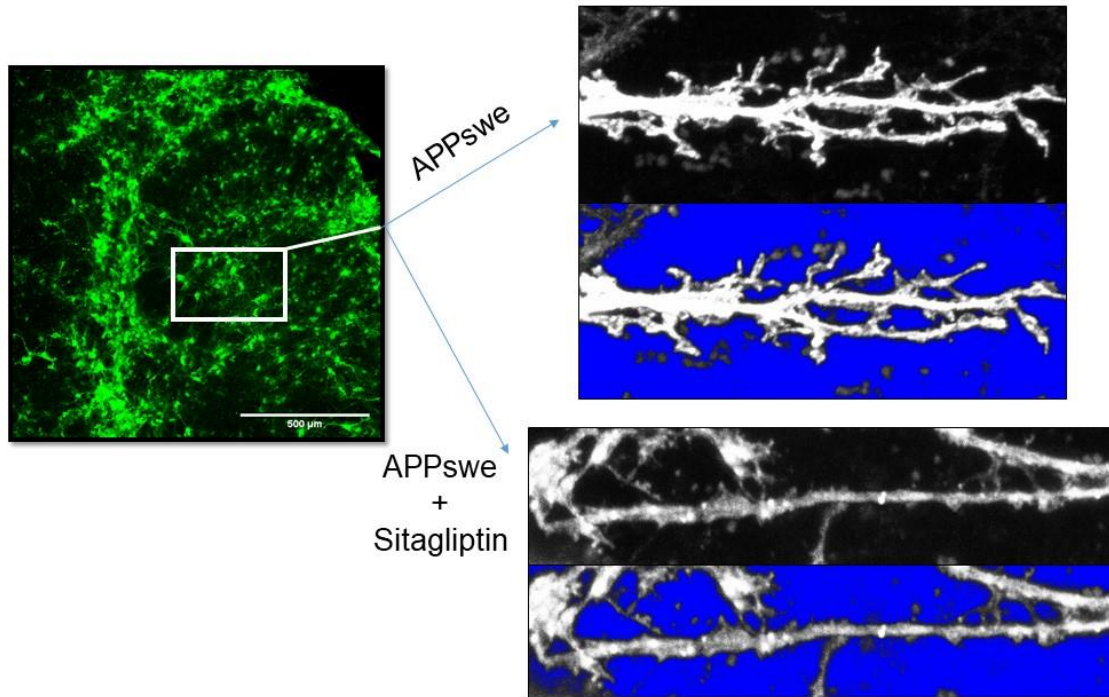


Figure 2. Valverde et al.

A



B

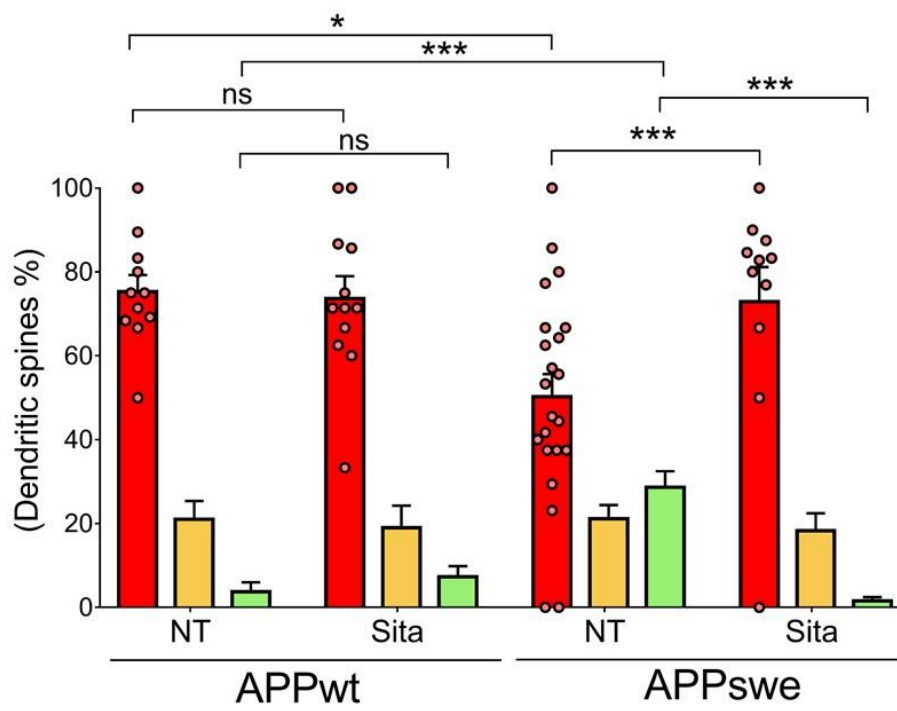


Figure 3. Valverde et al.

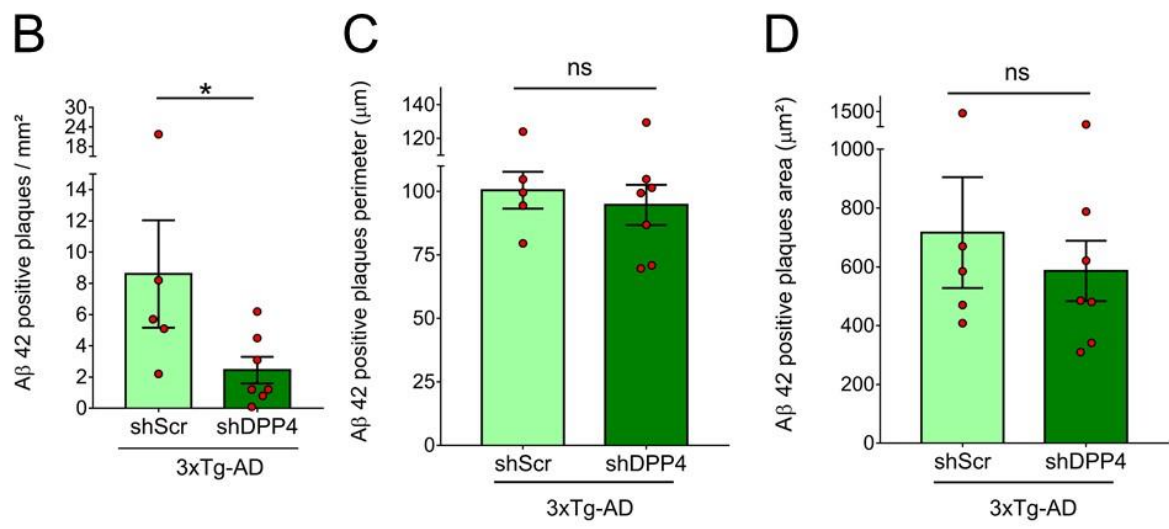
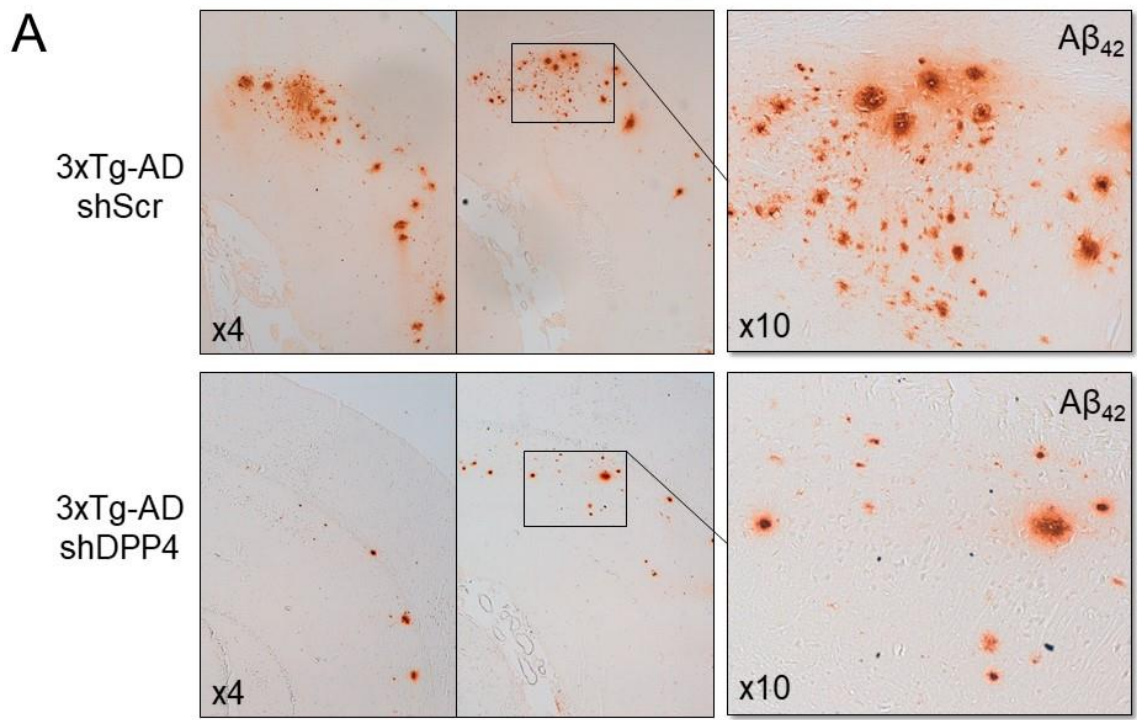


Figure 4. Valverde et al.

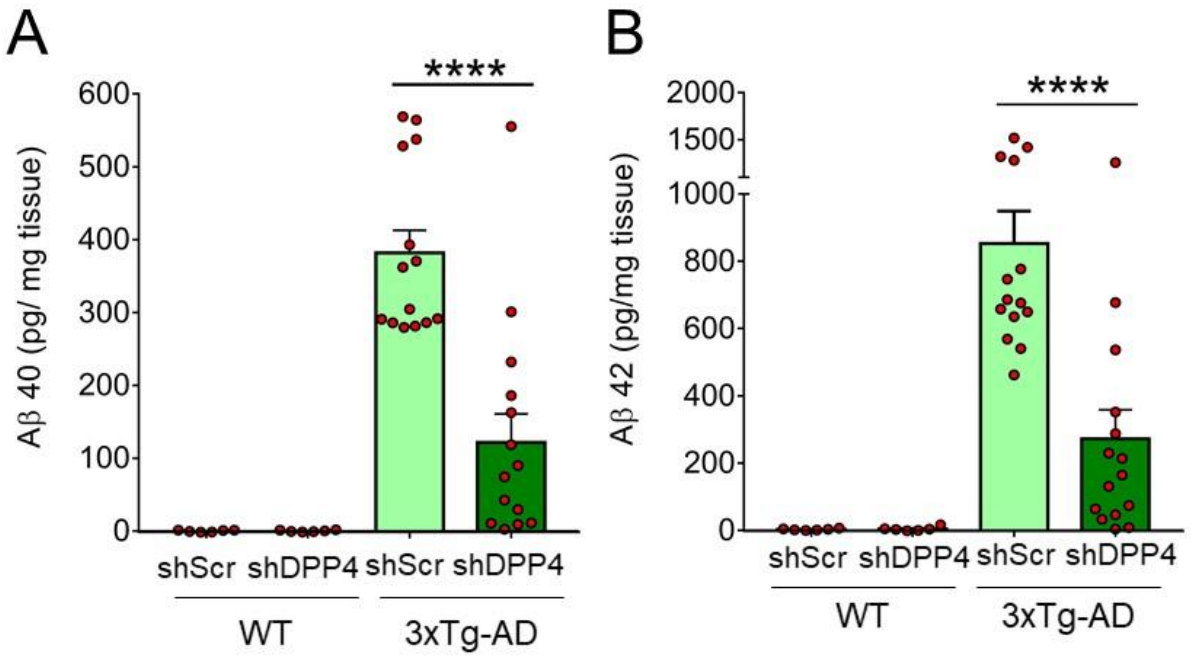


Figure 5. Valverde et al.

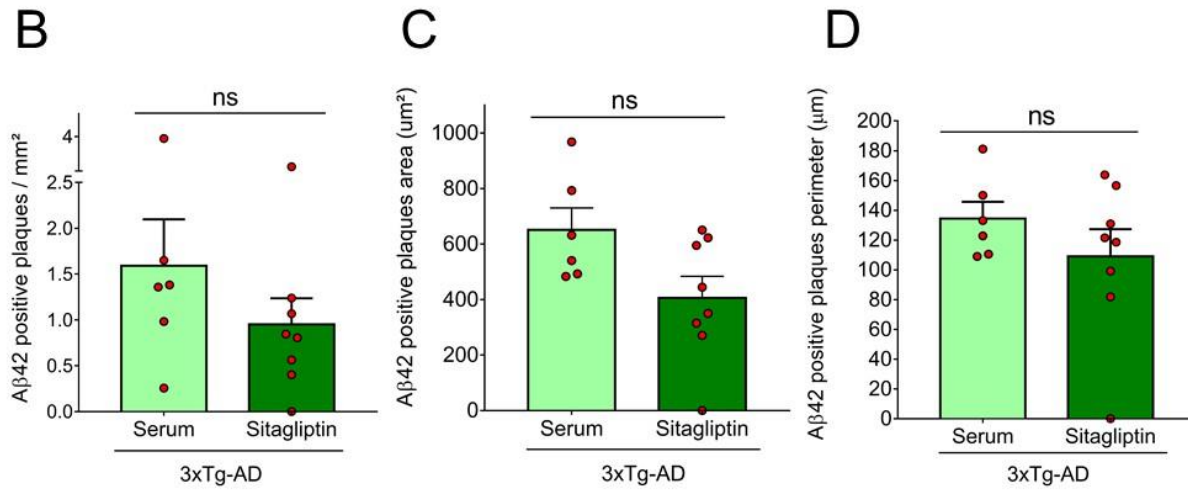
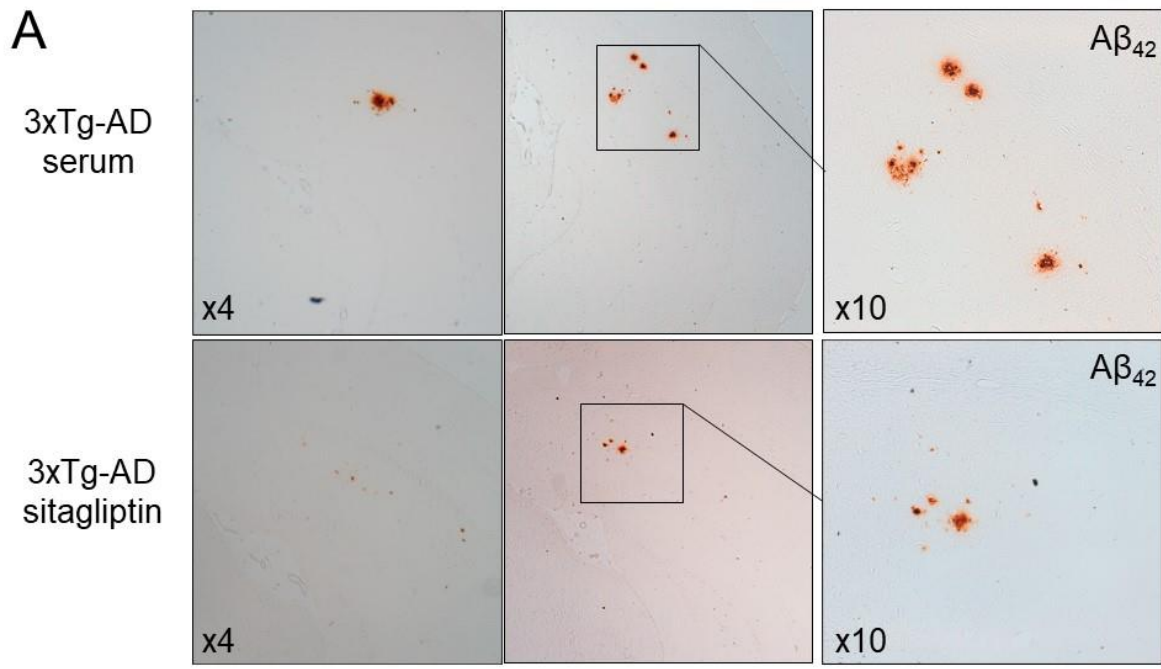


Figure 6. Valverde et al.

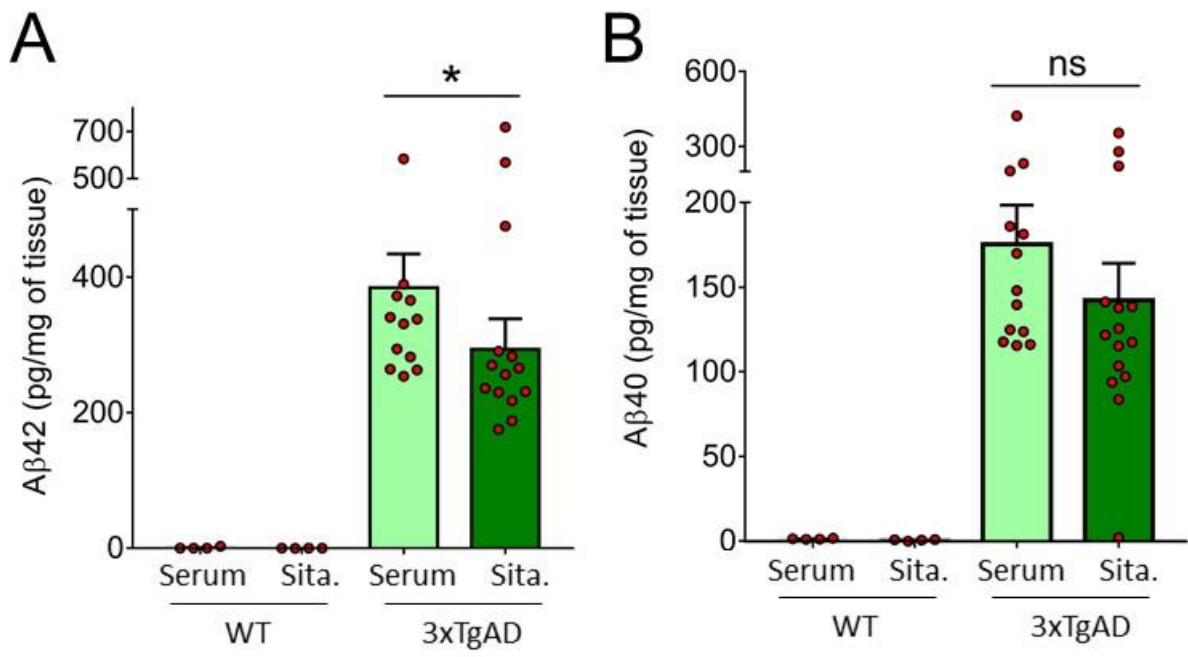
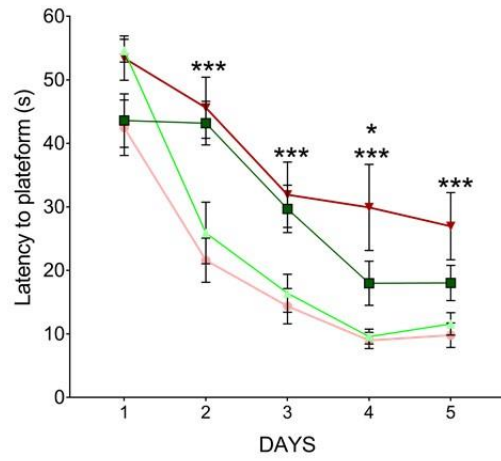


Figure 7. Valverde et al.

A



B

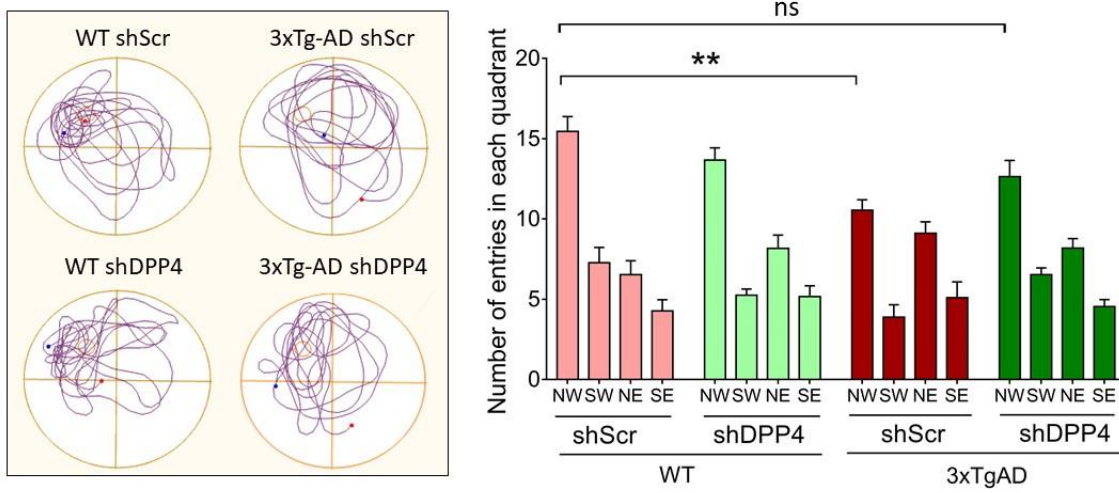


Figure 8. Valverde et al.

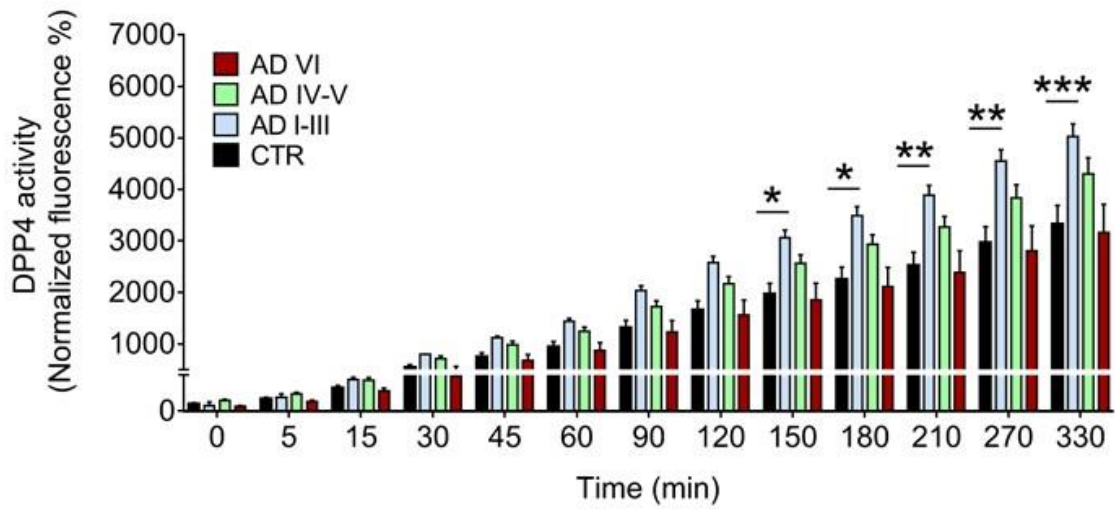
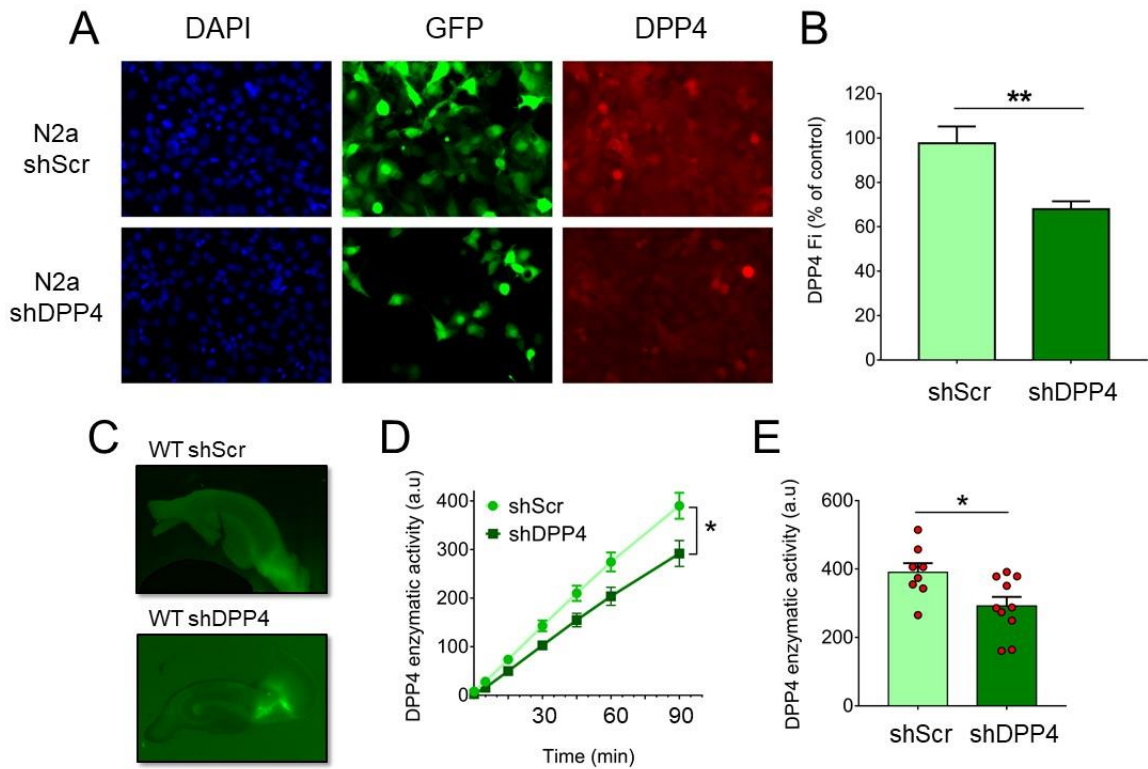
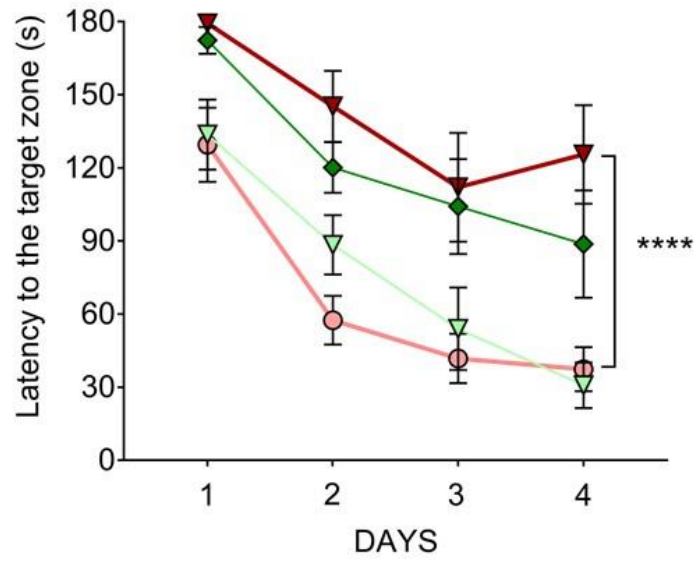
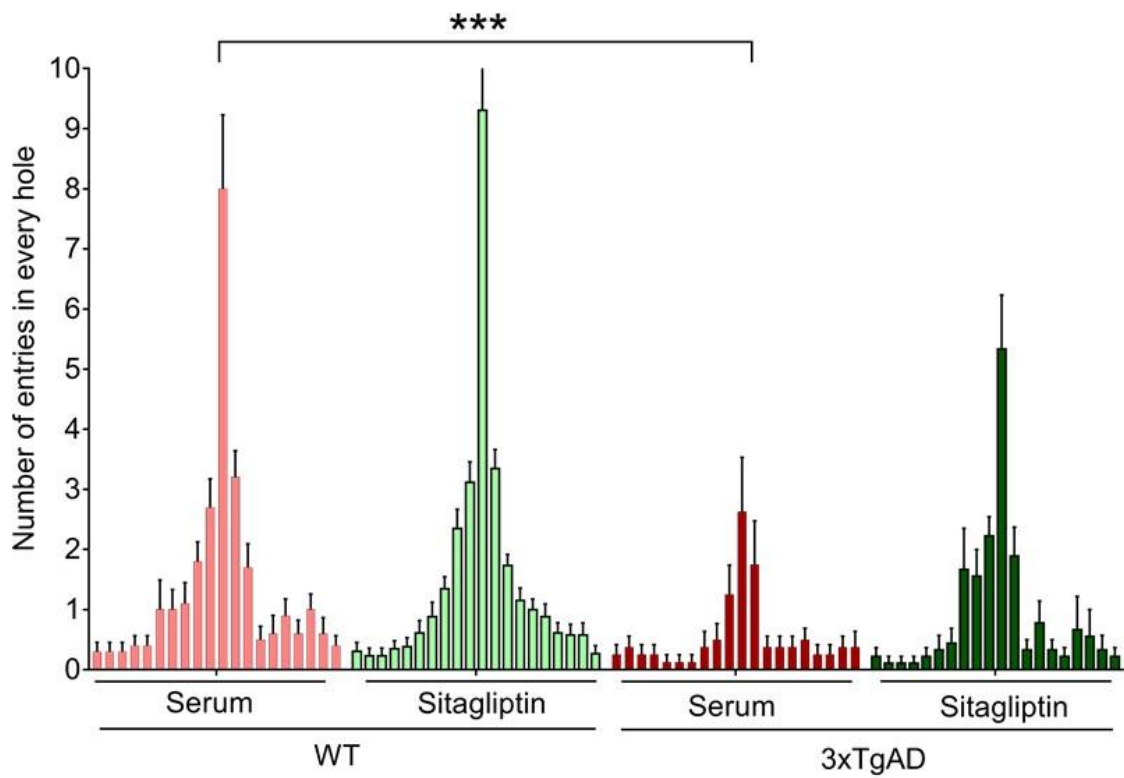


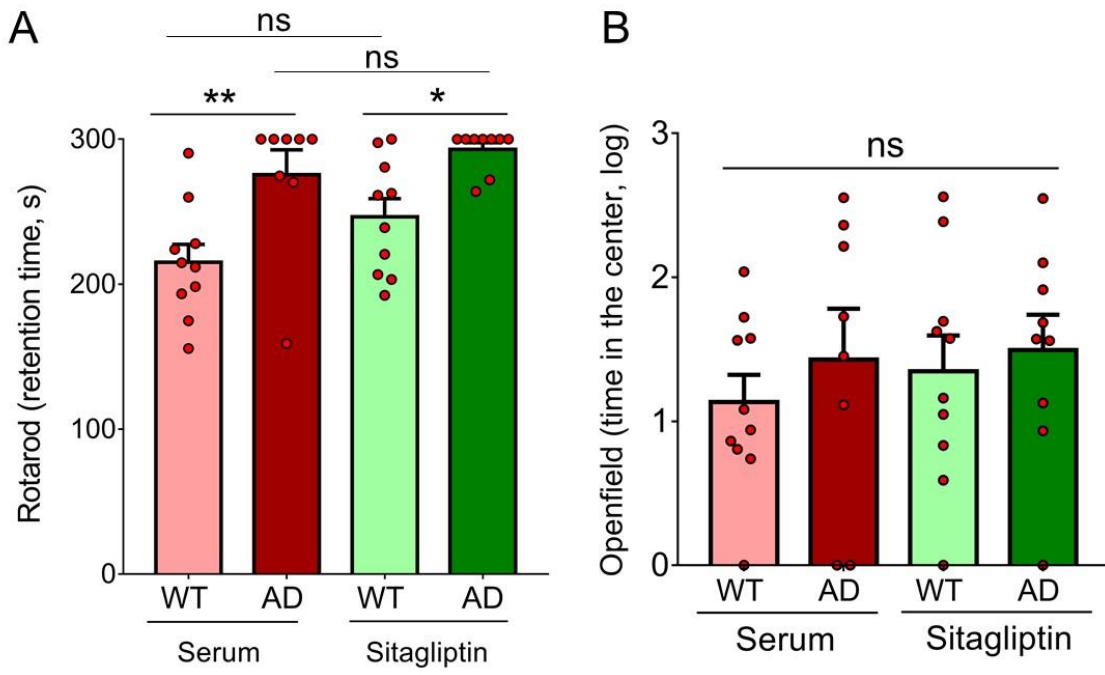
Figure 9. Valverde et al.



Suppl. Figure 1 Valverde et al.

A**B**

Suppl. Figure 2. Valverde et al



Suppl. Figure 3. Valverde et al.

Annexe de l'Article 2 : Données non publiées

Dans le cadre de ce projet, des résultats non publiés et rapportés dans la discussion seront ajoutés dans cette partie témoignant en outre de la complexité des tests comportementaux. En effet au cours des expériences, nous avons pu observer une implication de DPP4 dans la formation du peptide A β tronqué en région N-terminale et dans certains aspects de la MA. Cependant il est vrai que nous nous sommes heurtés à une difficulté de compréhension sur les tests de mémoire spatiales. Cela m'a donc conduit à émettre des hypothèses expliquant ces résultats (**développée dans la partie discussion**).

Les souris 3xTg-AD invalidées pour DPP4 (12 mois), ne présente pas d'amélioration de mémoire spatiale dans le test du Barnes Maze.

Afin de mesurer l'implication de DPP4 dans les déclin cognitifs, nous avons choisi d'analyser la mémorisation de nos souris avec le test du Barnes Maze et de la piscine de Morris. En parallèle, nous avons effectué les mêmes tests pour le projet concernant l'aminopeptidase A (résultats présentés dans l'article 1). Cependant comme j'ai pu déjà le souligner, il s'avère que la compréhension des résultats pour DPP4 semble plus compliquée. Dans la **Figure 35**, nous pouvons constater qu'il n'y a aucun effet de l'invalidation génétique de DPP4 (shRNA) sur l'apprentissage (**Figure 35.A**) et sur le nombre d'entrées dans le trou cible ainsi que les trous voisins (**Figure 35.B**). La répartition du nombre d'entrées est quasi-similaire à celle des souris 3xTgAD injectées avec les virus exprimant le shRNA scramble.

Le traitement à la sitagliptine dans les souris 3xTg-AD (10/11 mois), ne montre pas d'amélioration de mémoire spatiale dans le test de la piscine de Morris.

Le traitement appliqué pendant un mois avec la sitagliptine, à hauteur de 15mg/kg sur les souris 3xTgAD âgées de 10/11 mois, n'a pas permis de mettre en évidence un effet bénéfique de cette drogue sur l'apprentissage des souris 3xTgAD dans le test de la piscine de Morris (**Figure 36**). La courbe d'apprentissage ne montre aucun changement entre les souris 3xTgAD traitées avec le sérum et les souris 3xTgAD traitées avec la sitagliptine (**Figure 36A**).

Par ailleurs, le traitement n'induit pas de toxicité puisque les souris WT ne montrent aucune déficience des fonctions mémorielles. Par la suite, le test de mémorisation ne démontre pas non plus d'effet positif du traitement, que ce soit concernant le nombre d'entrées dans la zone « cible » (**Figure 36B**) ou dans les différents cadrants (**Figure 36C**). Comme je le suggère dans la discussion, et malgré les résultats d'un traitement bénéfique à la sitagliptine dans certains articles, il serait préférable d'effectuer des tests de mémorisation spatiale avec l'omarigliptine, un nouvel inhibiteur de DPP4, qui semble pénétrer plus facilement dans le SNC.

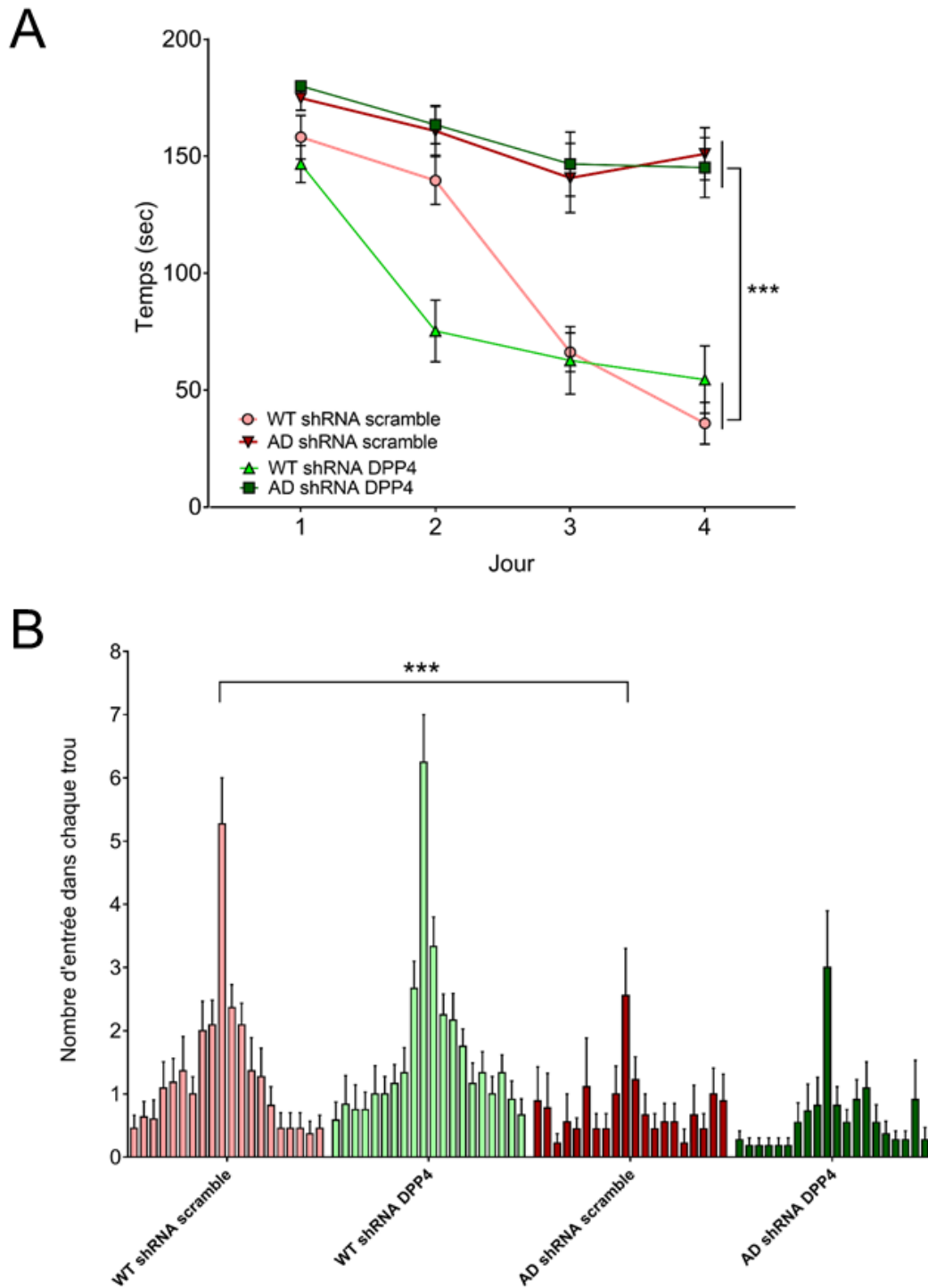


Figure 35: Test du Barnes Maze dans les souris 3xTgAD invalidées avec les shRNAs scramble ou DPP4. A. Courbe d'apprentissage du Barnes Maze, B. Répartition du nombre d'entrée des souris dans les différents trous (rose clair : WT shScr ; vert clair : WT shDPP4 ; rouge foncé : 3xTgAD shScr ; vert foncé : 3xTgAD shDPP4).

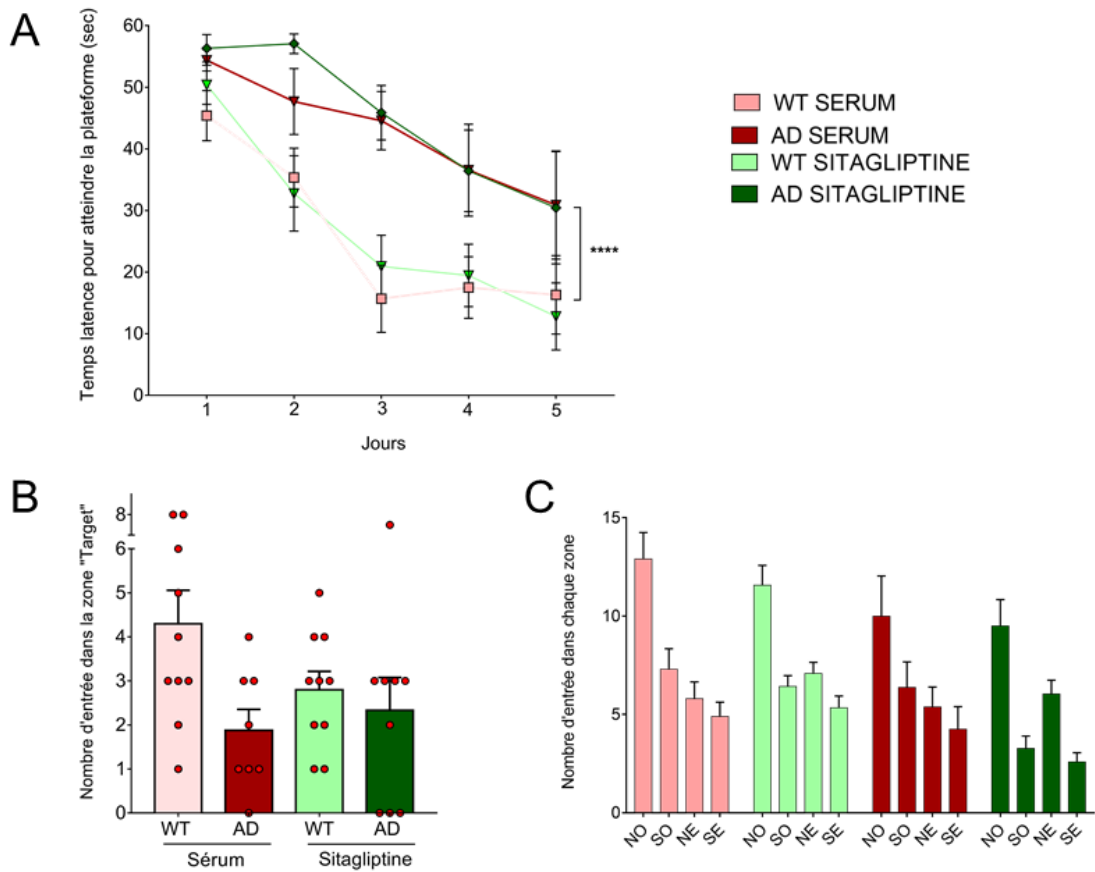


Figure 36: Test de la piscine de Morris dans les souris 3xTgAD traitées ou non avec la sitagliptine. A. Courbe d'apprentissage de la piscine de Morris, B. Répartition du nombre d'entrée des souris dans la zone « cible » et C dans les différents quadrants de la piscine (rose clair : WT shScr ; vert clair : WT shDPP4 ; rouge foncé : 3xTgAD shScr ; vert foncé : 3xTgAD shDPP4).

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette discussion, plusieurs aspects seront abordés sur A β s et sa réelle implication physiopathologique dans la maladie d'Alzheimer. En effet A β , est-il un acteur physiologique où les effets sont dépendants de sa concentration et/ou de sa localisation, un initiateur de la MA ou simplement une conséquence de la dégradation du C99 ? Ce catabolite produit précocement ne semblerait-il pas plus être l'initiateur de la pathologie ? En intégrant naturellement mes résultats et les idées nouvelles, les A β s tronqués en région N-terminale ne sont-ils pas plus représentatifs de la toxicité d'A β via leurs propriétés biochimiques et leur propagation dans le cerveau ?

Mes travaux apportent des idées nouvelles sur la biosynthèse de ces fragments A β s tronqués en N-terminal, avec l'implication de l'aminopeptidase A et de la dipeptidyl peptidase 4 dans la pathologie et donnent de nouvelles perspectives de thérapie. Ces enzymes, majoritairement étudiées dans l'hypertension et le diabète, ne sont-elles pas sujettes à des dérégulations connues entre un vieillissement sain et un vieillissement pathologique qui engendreraient des dysfonctionnements cellulaires aboutissant à la MA ? Toutes ces questions seront traitées dans les pages suivantes.

Le rôle physiologique ou pathologique du peptide A β dépend-t-il seulement de sa concentration ?

Malgré les études considérables sur le peptide A β , depuis 1984, les rôles du peptide amyloïde sont contradictoires. Ce peptide présente des effets à la fois toxiques mais aussi bénéfiques dans le cerveau. Pour réconcilier et mieux comprendre l'effet d'A β s en situation physiologique et pathologique (dans la MA), plusieurs paramètres doivent être pris en considération. Le premier constat est que les différentes formes d'A β s n'ont pas la même toxicité. En effet de manière très claire, A β ₁₋₄₂ ou A β _{x-42} constituent les principales formes toxiques dans la pathologie, à l'inverse d'A β ₄₀ et des A β s tronqués en région C-terminale. En outre, leur forte hydrophobicité et leur conformation stérique (structure quaternaire) leur confèrent des cinétiques d'agrégations excessivement rapides permettant la formation d'A β s sous forme oligomérique et fibrillaire.

Le deuxième paramètre important est l'assemblage de ces peptides (Meral et Urbanc 2013). Aucun article ne présente la diversité exacte des peptides A β s dans les formes oligomériques, même si cette information pourrait être capitale pour déterminer leurs effets

d'un point de vue fondamental et pour proposer une thérapie dirigée sur les oligomères. Une publication de 2012 introduit aussi une notion d'A β oligomères solubles vs membranaires. Un mécanisme distinct d'oligomérisation et d'insertion membranaire contribuerait aux rôles neurotoxiques qu'ils exercent (Y.-J. Zhang et al. 2012). Chronologiquement et selon leur hypothèse, l'A β membranaire serait une étape précoce pour limiter un microenvironnement pathogénique alors qu'avec la progression de la maladie, l'A β soluble est favorisé et provoque une toxicité après liaison à certains récepteurs membranaires. Par ailleurs, les connaissances actuelles révèlent que ces formes oligomériques altèrent non seulement la LTP, la LTD mais aussi interagissent avec la membrane plasmique au niveau des radeaux lipidiques et s'accumulent dans les lysosomes et les endosomes. Les études parlent même d'une corrélation entre la production de ces oligomères et les déclinés cognitifs. L'interaction avec la membrane déclenche la formation de pores ioniques déstabilisant l'équilibre osmotique de la cellule et entraîne, par exemple, la phosphorylation de Tau après sa fixation avec les protéines membranaires PrPc ou NKA α 3 (Cline et al. 2018).

La concentration semble être aussi un paramètre essentiel à la toxicité du peptide A β . En effet, le peptide amyloïde agit de manière pathologique quand il atteint un effet seuil (Harigaya et al. 2000). Dans le cas des formes oligomériques, il s'avère qu'à partir du nanomolaire son effet délétère apparaît (Gerakis et al. 2016; Maezawa et al. 2011). De même pour l'A β _{pE3-42} dans des conditions *in vitro*, 5% suffisent à augmenter de manière significative la cinétique d'agrégation de l'A β ₄₂. A l'inverse, quand A β est à un niveau proche du picomolaire, ces fonctions sont physiologiques (détaillées dans la partie physiologie d'A β).

Enfin, le pH et la composition lipidique de la membrane plasmique représentent des paramètres capitaux au développement de la pathologie et ouvrent de nombreuses hypothèses. Dans la maladie d'Alzheimer, le pH lysosomal et endosomal semble alcalinisé. La dérégulation du pH induit une altération des activités enzymatiques de la cellule, sur la génération d'A β ainsi que sa localisation, sur l'excrétion de ce peptide et sur son insertion dans la membrane plasmique (Prasad et Rao 2018; J. Shi et al. 2019). L'ensemble des activités est modifié et promeut potentiellement la formation de catabolites, au départ très peu existant, dans certains compartiments cellulaires ou types cellulaires, telles que les cellules gliales. En ce qui concerne la composition lipidique des membranes, de nombreux articles attestent que la modification membranaire, avec entre autres l'augmentation du cholestérol ou des céramides, serait un facteur de génération et de propagation du peptide amyloïde (Dominguez et al. 2014). En effet des simulations informatiques observent que des modifications de la composition

lipidique dans la membrane altèrent la pression transmembranaire et la liaison des lipides chargés avec certaines enzymes. En 2018, un article observe que ces changements favorisent les états de conformations actifs de la sous-unité catalytique de la γ -sécrétase (Aguayo-Ortiz, Straub, et Dominguez 2018). Une deuxième publication stipule que l'augmentation des céramides mènent à une meilleure stabilisation de la β -sécrétase et promeut le clivage de la β APP par la voie amyloïdogène (Puglielli et al. 2003).

L'ensemble des découvertes énumérées dans cette partie permet d'imaginer, qu'en situation pathologique, les modifications ioniques, lipidiques et pH-métriques altèrent considérablement la génération de catabolites dérivant de la β APP en changeant les états de conformation des enzymes ainsi que leurs localisations.

Le rôle émergent des formes tronquées d'A β dans la maladie d'Alzheimer

L'étude des A β tronquées en région N-terminale constitue une voie prometteuse pour la création de médicaments. En effet ces fragments, sont pour la plupart spécifiquement présents dans la MA. De même, ces peptides présentent des propriétés neurotoxiques, d'une part en s'agréant en oligomères et d'autre part, en induisant une forte perte neuronale. Les cibler, pourrait permettre d'éviter les échecs des essais cliniques et les effets indésirables, connus dans le passé. Cependant, l'étude de ces fragments paraît plus compliquée que prévu, puisque la plupart des modèles murins ne sont pas représentatifs des quantités de peptides tronqués présents dans le cerveau de patient atteints de MA. En 2017, une étude dévoile que plus de 70% de l'A β présents dans le cerveau de patient MA contient une troncation en région N-terminale (A β_{2-x} ; A $\beta_{pE3/3-x}$; A β_{4-x} ; A β_{5-x} , A β_{8-x} et A $\beta_{pE11/11-x}$) (Wildburger et al. 2017). A l'inverse, les modèles murins de MA dont le modèle 3xTg-AD révèlent très peu de formes d'A β_{pE3-x} . Dans mes conditions expérimentales et par immunohistochimie, j'ai réussi à détecter leur présence à partir de l'âge de 12 mois mais à des quantités très faibles (**images présentes dans l'article 1**). De même grâce au seul kit Elisa présent sur le marché, le peptide A β_{pE3-42} n'est facilement détectable dans les fractions insolubles et solubles du modèle 3xTg-AD qu'entre 15 et 17 mois. La détection de l'A β_{pE3-x} dans les coupes de cerveau dépendait du démasquage choisi. Sachant que cette forme était au core profond des plaques, j'ai tout d'abord démasqué avec de l'acide formique pure pendant 12 minutes. Ce protocole m'a permis de

mettre en évidence la présence de ces formes d'Aβs dans les cellules gliales (Wirhth et al. 2013). Surprise au premier abord, j'ai voulu montrer une colocalisation. Par une technique innovante « OPAL », je pouvais utiliser les mêmes espèces réactives pour des anticorps primaires différents, cependant il me fallait démasquer au citrate de sodium pour la GFAP ou Iba1. Malheureusement après plusieurs mises au point, il m'a été impossible d'observer le marquage des formes Aβ_{pE-x} avec la GFAP ou Iba1. Le démasquage au citrate de sodium bloque l'AC en empêchant son insertion dans les cellules gliales mais l'on peut apercevoir un marquage dans les cellules neuronales (**Figure 29**). Par comparaison morphologique au DAB, on peut affirmer la présence des formes Aβ_{pE3-x} dans les cellules gliales. Etant donné que notre modèle 3xTg-AD présente les transgènes humains spécifiquement dans les neurones avec le promoteur Thy1.2, on peut suggérer que l'Aβ_{pE3-x} tronquée en région N-terminale est un dérivé direct du C99 ou Aβ présents dans les cellules gliales après leurs propagations au travers de vésicules sécrétées par les neurones (ex : exosomes). Pour étudier ce paramètre, il serait intéressant de faire des expériences avec les systèmes micro-fluidiques pour connaître la dynamique de formation de ce fragment. Par ailleurs, vu que les cellules gliales sont marquées par ce fragment, l'étude des effets de l'Aβ_{pE3-x} sur la microglie et/ou l'astroglie représente une nouvelle voie d'exploration. Les seuls articles parlant de ce sujet, montrent des dommages neuronaux après la propagation de micro-vésicules extracellulaires venant des microglies ou d'astrocytes (Joshi et al. 2014 ; Söllvander et al. 2016). Plus précisément, le Dr Söllvander observe la présence des fragments Aβ_{x-42} dans les astrocytes avec la faculté de persister dans le temps et suppose que les astrocytes modifient les propriétés des Aβs. Le développement d'outils tels que des Elisass multiplexes serait donc indispensable pour mieux déterminer le rôle de ces fragments dans la pathologie.

Les enzymes, cœurs protéolytiques des catabolites toxiques dans la pathologie

Effectivement les catabolites de la βAPP : C99, Aβs, AICD, Aηβ...mais aussi Tau et pTau induisent dans leur intégralité des dérégulations cellulaires déterminants pour le développement de la MA. Cependant, ce ne sont que les conséquences du déséquilibre aigu puis chronique énoncé dans les paragraphes précédents qui provoque leur formation au travers de multiples changements d'activités enzymatiques dans le cerveau. En effet, les acteurs principaux de ces voies métaboliques sont la β-sécrétase, la γ-sécrétase, la néprilysine, l'IDE,

les aminopeptidases, les MMPs, les dipeptidyl-peptidases, les kinases (GSK3 β , ERK1, cJUNk). L'activité catalytique et l'interaction de ces enzymes avec leurs substrats sont régulées finement par la concentration ionique en intra- et extracellulaire, la localisation cellulaire, la composition lipidique et par les différents partenaires. La répartition des ions permet l'électroneutralité, l'équilibre osmotique, l'équilibre pH-métrique et le maintien de la perméabilité membranaire. Dans le cas de la MA, la répartition des ions (Zn²⁺, Cu²⁺ et Ca²⁺), la composition lipidique des membranes, la localisation sub-cellulaire des enzymes sont entièrement déséquilibrées ce qui entraîne une stabilisation du peptide A β , son oligomérisation et la création de canaux. Par exemple, le Zn²⁺ se fixe à la β APP empêchant la coupure par l' α -sécrétase et donc promeut la génération de catabolites toxiques. Cette fixation lui procure aussi une résistance au catabolisme en empêchant les métalloprotéases 2/3 (MMP2/3) ou les sécrétases de cliver le peptide A β .

Au vu de ces déséquilibres, l'aminopeptidase A (APA) et la dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) ne sont-elles pas aussi des sources inhabituelles de catabolites toxiques de la β APP pour la MA ? Et qu'en est-il des multiples autres substrats qu'elles régulent dans cette pathologie. L'ensemble de ces questions seront abordées ci-après.

1. [Rôle de l'Aminopeptidase A dans la Maladie d'Alzheimer](#)

L'aminopeptidase A est impliquée dans des mécanismes pathologiques de la MA, en touchant directement les catabolites dérivés de la β APP et en modifiant aussi l'expression de ces substrats physiologiques connus tels que l'Ang III ou la CCK8. Dans la plupart des cas, APA est étudiée pour son rôle dans l'hypertension cérébrale, étude initiée en partie par le Pr Bernard Roques avec la synthèse de multiples inhibiteurs dirigés contre APA. Son rôle dans la MA est à ce jour très peu étudié mais beaucoup d'indices indirects stipulent qu'APA a une importance considérable sur le développement de la pathologie. Premièrement, APA est reconnue comme étant le principal facteur de l'hypertension cérébrale et un lien entre l'hypertension et la Maladie d'Alzheimer est accepté par la majorité de la communauté scientifique (Carnevale et al. 2016 ; de Heus et al. 2019 ; Ninomiya et al. 2011). Plus exactement, il s'avère que l'hypertension en milieu de vie corrèle significativement avec le développement de déclin cognitif. Dans le cadre de mon travail, j'ai pu aussi observer une augmentation de l'activité d'APA dans les homogénats de cerveaux de patients seulement aux stades précoces de la pathologie, rajoutant un argument supplémentaire sur cette notion temporelle. En effet, les malades à un stade avancé présenteraient davantage une hypotension. Une modulation inappropriée de l'activité d'APA au cours du vieillissement serait donc

suffisante pour l'impliquer dans la MA. Cependant, une évidence incontestable est rapportée entre l'hypertension et l'accumulation/agrégation du peptide amyloïde (Ashby et al. 2016). Les individus hypertendus ApoE4+ n'ayant pas de traitement contre l'hypertension présentent un dépôt d'A β plus important que ceux disposant de médicaments (Rodrigue et al. 2013). Plus précisément, l'accumulation du peptide A β semble être en lien avec le système RAS (système rénine-angiotensine-aldostérone) où APA catalyse l'AngII en AngIII (stimulateur tonique). L'ensemble des enzymes dans cette voie (ACE, IDE, néprilysine) est moins présent chez les individus en hypertension ce qui expliquerait la diminution de dégradation du peptide A β (Ashby et al. 2016). De plus, une étude récente témoigne d'une augmentation de l'Angiotensine III dans les cas Alzheimer, ce qui sous-entend que l'expression et/ou l'activité de l'Aminopeptidase A sont dérégulées. Dans leur étude, ils démontrent une diminution de l'expression d'APA mais une tendance à l'augmentation de son activité. Au sein de mon équipe, nous sommes les premiers à émettre l'hypothèse qu'APA impacte directement la pathologie en formant des peptides amyloïdes tronqués en région N-terminale. Cette hypothèse vient de l'affinité particulière d'APA avec l'acide aspartyl en première position de la région N-terminale d'une protéine, 1^{er} acide aminé présent sur le peptide A β . En 2009, le Dr Sevalle a montré dans des conditions *in vitro*, le rôle de cette enzyme sur le clivage du peptide amyloïde par le biais de produits pharmacologiques (Sevalle et al. 2009). En présence de l'EC33 ou de p1302, l'immunoréactivité d'A β entier est augmentée de manière dépendante de la dose d'inhibiteur utilisée. J'ai donc analysé l'impact d'une diminution d'activité ou d'expression de l'enzyme APA par diverses approches. Premièrement, j'ai pu vérifier par spectrométrie de masse le clivage du peptide A β en région N-terminale sur le premier acide aminé libérant la forme A β _{2-x}. Cette réaction est spécifique du clivage APA puisqu'en présence d'Amastatine le ratio A β ₂₋₄₀/A β ₁₋₄₀ est diminué. Etant donné que les formes tronquées du peptide A β altèrent la neurotransmission et causent une forte perte neuronale, l'étude de la maturation des épines dendritiques sur les coupes organotypiques a renforcé l'idée que la présence des A β s est délétère pour la maturation des épines et expliquerait les perturbations de neurotransmission. De nombreux articles attestent que l'A β induit une perte synaptique, affecte la LTP et la LTD et que cela correspondrait à une perturbation de la dynamique morphologique des épines dendritiques. Dans mes conditions expérimentales, j'ai pu retrouver l'effet néfaste du peptide A β sur la morphologie des épines dendritiques. L'application de l'A β ₄₂ ou de l'A β _{pE3-42} synthétique montre une augmentation du nombre de filopodia, synonyme d'altération de la spinogénèse et d'immaturité des épines dendritiques. De même pour les coupes organotypiques d'hippocampes infectées avec la β APP_{suédoise}, les filopodias sont en plus grand nombre.

Cependant lors de l'application du RB150, on détecte que les formes immatures sont beaucoup moins nombreuses et que la répartition des types d'épines correspond à celle retrouvée pour les coupes organotypiques d'hippocampes contrôles. Le résultat dénote donc que l'inhibition de la formation des peptides A β N-tronqués via le RB150 favorise la présence d'épines dendritiques matures et diminuerait donc la synaptopathie. Pour approfondir le rôle d'APA sur le développement de la pathologie, j'ai continué ce projet avec des approches *in vivo*. Nous avons étudié, via des approches génétique et pharmacologiques, l'impact de la formation des A β N-tronqués sur les déclin cognitifs, le niveau d'A β _{1-40/42} et d'A β _{pE3-42}, sur la charge en plaques séniles et sur les dysfonctions mitochondriales et lysosomiales par microscopie électronique. Dans un premier temps, pour valider notre hypothèse de l'action d'APA sur A β , nous avons opté pour un gavage chronique au RB150 pendant 1 mois sur des souris âgées d'environ 15 mois. Nous avons mis en évidence, par des techniques d'Elisa, la baisse de la forme A β _{pE3-42} dans les fractions soluble et insoluble. Ce résultat nous confirme une nouvelle fois qu'APA est impliquée dans la troncation en région N-terminale du peptide A β et qu'il est un facteur en amont de la glutaminyl cyclase pour la formation de l'A β _{pE3-42}, peptide considéré comme étant la forme la plus toxique. En immunohistochimie, les souris révèlent la présence des formes A β _{pE3-x} dans les cellules gliales dans les deux conditions. De plus, les marquages avec les anticorps Nu1 et 4G8 ne révèlent pas plus d'informations, malgré une tendance visuelle à une diminution de protéines agrégées via Nu1 et à une modification de la structure des plaques observée avec le 4G8 (plaques plus compactes). Cependant, nous sommes dans une tranche d'âge où la baisse des formes pyroglutamates aperçue en Elisa n'est pas suffisante ou que le traitement n'a pas été assez long pour visualiser un effet marqué de la désagrégation des plaques séniles (Figure 31). Notre deuxième stratégie a donc été d'administrer le RB150 en intrapéritonéal ou d'injecter le shRNA APA, dans des souris plus jeunes. Après avoir vérifié l'efficacité du shRNA APA, les résultats démontrent clairement une amélioration cognitive des souris 3xTg-AD exprimant le shRNA APA comparé aux souris 3xTg-AD. Cette amélioration cognitive est corrélée à une diminution drastique du nombre de plaques A β ₄₂ positives et une diminution de la quantité d'A β ₄₂ par Elisa, sans modifier drastiquement les fonctions lysosomiales et mitochondriales. Les tests comportementaux révèlent une amélioration sur l'apprentissage dans le test Barnes Maze et dans le test de la piscine de Morris pour les souris stéréotaxiées et les souris traitées au RB150. Dans le cas du test de mémorisation, on peut observer une tendance à l'amélioration du nombre d'entrées dans la « zone cible », de même pour les différents quadrants définis de la piscine. Dans le test du Barnes Maze, la gaussienne

représentant l'exploration des souris (autour des 20 trous de la table) montre également une préférence pour le trou cible ainsi que les trous voisins. A l'inverse des souris 3xTg-AD, pour lesquelles la gaussienne est plus plate, pouvant être interprété comme l'effet du hasard. L'ensemble de mes résultats confirme l'implication de l'aminopeptidase A dans le développement de la pathologie avec son implication dans la troncation du peptide amyloïde.

Cependant, il est vrai que l'aminopeptidase A est reconnue pour agir sur plusieurs substrats ayant des dérégulations dans la MA (Goto et al. 2006; Holmes, Spradling Reeves, et Cox 2017). En effet, la CCK8 appartenant à la famille des cholécystokinines est une hormone anorexigène qui procure la sensation de satiété lors d'une prise alimentaire. Elle stimule la libération enzymatique pancréatique et biliaire au niveau du duodénum pour permettre la digestion alimentaire. Cependant, CCK8 est aussi considérée comme étant une neurohormone importante pour la mémorisation après sa fixation avec le récepteur CCKB. Plusieurs articles révèlent que l'ajout de CCK8 dans diverses conditions expérimentales, améliore considérablement les performances cognitives, entre autre par une augmentation de la neurogénèse, une diminution de l'apoptose et une plasticité cérébrale par un remodelage des épines dendritiques (Schneider et al. 2009 ; Yang et al. 2013). A l'inverse des modèles de rongeurs invalidés pour CCK performant moins bien dans le test de la piscine de Morris que les souris contrôles. Récemment, il a même été proposé que le CCK devienne un biomarqueur de la MA puisqu'elle est retrouvée comme étant moins exprimée dans les cerveaux de patients MA que dans les patients MCI (Plagman et al. 2019).

La neurokinine B, deuxième substrat connu d'APA, régule principalement la reproduction et la prééclampsie. Cependant, cette protéine appartient à la famille des tachykinines (Subs.P, NeurokinineA) et semble être aussi neuroprotectrice (Press-Sandler et Miller 2020). En effet, les premiers articles sur la neurokinine et la MA montrent une réversion partielle de la toxicité de l'A β dans des neurones hippocampiques notamment en inhibant la libération du Ca²⁺ par les récepteurs NMDA et les récepteurs au Glutamate. La neurokinine B semble aussi se lier avec le Cu²⁺ pour réguler sa concentration et limiterait donc l'interaction du cuivre avec le peptide A β et son assimilation dans les cellules astrocytaires (Grosas et al. 2014 ; Russino et al. 2013).

Pour finir, la Chromogranine A et l'Angiotensine III sont aussi dérégulées dans la MA et présentent des voies d'exploration intéressantes pour la MA. La chromogranine A est une protéine sécrétée par les cellules endocrines ou les neurones, en présence des catécholamines (Helle et al. 2007). Elle est aussi considérée comme une pro-hormone puisqu'elle génère de nombreux produits de clivages essentiels pour l'homéostasie calcique, le système immunitaire

et la fonction cardiaque (D. Zhang et al. 2009). Une invalidation de cette protéine entraîne une sévère hypertension et une augmentation accrue des catécholamines (D'amico et al. 2014). Dans le SNC, la chromogranine A a un rôle important dans le système immunitaire inné et régule la production de l'interleukine-1 β dans les cellules microgliales via l'activation du NF- κ B et de la pro-caspase 1, dépendante de la CatB. Dans le cas de la MA, plusieurs articles témoignent de la présence de cette protéine aux abords des plaques séniles, associée avec une activation microgliale (Rangon et al. 2003 ; Tatullo et al. 2019 ; Wu et al. 2013). Dans le cadre de mon projet, j'ai pu observer des pistes montrant un lien entre la neuroinflammation et APA dans la MA (Figure 29, Figure 30). Ces résultats procurent une nouvelle voie d'exploration sur comprendre l'impact de l'invalidation d'APA dans le développement de la MA. Est-ce une conséquence de l'élimination des formes toxiques d'A β ou cela correspondrait à une autre voie d'APA provoquant une aide à l'élimination de l'accumulation des catabolites ? Par ailleurs, l'étude d'une cohorte de patients révèle une baisse caractéristique de la vasostatine. Ce dérivé de la chromogranine A se situe dans sa région N-terminale où APA clive et l'aminopeptidase A pourrait donc être le facteur de sa diminution. Pour finir, un unique article récent témoigne de l'augmentation de l'angiotensine III dans les MA et est associé avec la pathologie Tau et A β (Kehoe et al. 2017).

L'ensemble de ces recherches appuie de manière irréfutable l'implication de l'aminopeptidase A dans la MA, en touchant directement le peptide A β et en affectant ses différentes autres cibles. L'augmentation de son activité provoquerait à la fois l'augmentation des formes toxiques du peptide amyloïde, inactiverait la CCK8 et la neurokinine B connues pour être neuroprotectrices, inhibe la vasostatine et l'Ang III provoquant l'hypertension tandis que la chromogranine A, présente dans les plaques jouerait sur l'activation microgliale.

2. Rôle de la Dipeptidyl-peptidase 4 (DPP4) dans la Maladie d'Alzheimer

Depuis peu la recherche sur DPP4 dans la MA est en plein essor et représente une voie thérapeutique prometteuse du fait de son interaction avec le peptide amyloïde mais aussi de son implication dans la régulation inflammatoire et glycémique. En effet, la dipeptidyl peptidase 4 est une sérine exopeptidase retrouvée sous des formes homodimériques avec des fonctions adipokines, paracrines et endocrines (Lamers et al. 2011). Cette enzyme existe sous forme membranaire ou soluble et endosse de nombreuses fonctions, dérégulées dans la MA.

Principalement, la DPP4 est étudiée pour le diabète de type 2 avec la régulation des deux incrétines, GLP-1 et GIP (Röhrborn 2015). En effet, les résultats obtenus après l'inactivation de DPP4 dans les souris soulignent l'importance de cette enzyme sur la régulation glycémique avec une meilleure tolérance au glucose, une diminution du glucose et une augmentation de l'insuline dans le plasma. Ces peptides sont sécrétés lors de la prise alimentaire par les cellules L et K des intestins pour stimuler les cellules α et β du pancréas. Cette stimulation provoque la production de l'insuline et le déclin d'expression du glucagon afin de réguler la concentration du glucose dans l'organisme. Dans le cas du diabète, l'ensemble des articles scientifiques a révélé que les inhibiteurs spécifiques de DPP4, les gliptines, améliorent considérablement la résistance à l'insuline. Ce sont à ce jour des médicaments préconisés pour le diabète mellitus mais ils montrent également un effet bénéfique sur la cognition. La sitagliptine, inhibiteur utilisé dans le cadre de mon projet, est employée couramment avec la metformine pour réguler la production d'insuline du pancréas et la néoglucogenèse venant du foie. Depuis peu, un lien fort semble être suggéré par la communauté scientifique entre la MA et le diabète, on parle même de diabète de type 3 (Kshirsagar, et al 2020). En effet, des articles stipulent que l'augmentation de l'A β oligomérique interférerait avec la sensibilité à l'insuline dans les neurones hippocampiques. La voie de signalisation IRS-PI3K-Akt serait donc altérée et entraînerait des défauts d'assimilation du glucose via GLUT4, des dysfonctions autophagiques par la diminution de la voie mTor et une hyperphosphorylation de la protéine Tau ainsi qu'une activation des facteurs apoptotiques par une augmentation d'activité de la GSK3- β . De plus, l'augmentation de l'activité DPP4 dans la MA comme dans le diabète, inhibe l'expression de l'insuline et exacerbe donc les défauts de la voie IRS-PI3K-Akt.

A l'inverse, ce n'est que récemment que des équipes de recherche présentent DPP4 comme une enzyme de clivage jouant directement sur la formation d'A β tronquée en région N-terminale. Tout d'abord en 2013, un premier article a révélé l'interaction de DPP4 avec le peptide amyloïde par des techniques de microscopie à fluorescence et des tests de troncation sur A β (Sharoyan et al. 2013b). Un deuxième article publié en 2018 dévoile la surexpression de DPP4 dans les cerveaux humains de patients MA et son association avec les plaques amyloïdes (Bernstein et al. 2018). Mes résultats ainsi que ceux du Dr Antonyan confirment qu'A β est le substrat de DPP4 via la spectrométrie de masse. Plus précisément, les résultats récents révèlent les produits de clivage issus de cette interaction avec une augmentation au fil du temps de l'A β ₃₋₄₀ et de l'A β _{pE3-x} (Antonyan et al. 2018, résultats de l'article 2). Dans un contexte cellulaire, l'inhibition de DPP4 avec le p32/98 ainsi qu'une co-inhibition d'APA et de DPP4 mettent en évidence une augmentation de l'immuno-réactivité d'A β entier avec le

FCA18. Pour approfondir l'impact de cette enzyme sur le développement de la pathologie, le projet a été d'identifier l'impact d'une invalidation partielle de cette enzyme par l'injection d'un shRNA ciblant DPP4 à l'âge de 3 mois ou par un traitement pharmacologique à l'âge de 9/10 mois dans notre modèle murin 3xTg-AD. De plus, nous avons aussi étudié l'effet de la diminution de l'activité enzymatique d'APA et de DPP4 sur la morphologie des épines dendritiques dans les coupes organotypiques. L'ensemble des résultats témoignent que la baisse de DPP4 favorise la diminution drastique de l'A β ₄₀ et l'A β ₄₂ en fraction insoluble ainsi que la charge en plaque sénile en immunohistochimie dans les souris invalidées partiellement pour DPP4 (shRNA DPP4). Un profil similaire se dessine aussi avec le traitement chronique à la sitagliptine même si les résultats sont moins percutants et améliorent la maturation des épines dendritiques. En testant les souris avec les tests cognitifs de la piscine de Morris et du Barnes Maze, nous obtenons des résultats mitigés sur la mémorisation. Pour comprendre au mieux les divergences de résultats entre les tests comportementaux et entre les conditions, il est important de souligner les différences dans les protocoles expérimentaux. Notre choix a été d'étudier deux tests cognitifs qui sont catégorisés plus (piscine de Morris) ou moins stressants (Barnes Maze) pour la souris. Par ailleurs, il est important de savoir qu'à l'inverse du RB150 pour lequel l'inhibition est spécifiquement dans le cerveau, la sitagliptine est aussi active dans le système périphérique et son passage à travers la BHE semble faible (sujet de controverse). L'âge des souris étudiées dans ce projet est aussi un paramètre à prendre en considération puisque les souris shRNAs DPP4 ont été injectées à l'âge de 3 mois dans le subiculum et testées en comportement à l'âge de 12 mois, période plus adaptée à l'identification des troubles cognitifs. Dans le cas de l'approche pharmacologique, nous avons débuté le traitement (une dose à 15mg/kg en i.p) à partir de l'âge 9/10 mois et nous les avons testées en comportement à l'âge de 10/11 mois. A partir de ces éléments, plusieurs hypothèses peuvent être émises, premièrement il est important de savoir que le modèle 3xTg-AD présente un phénotype d'apathie et qu'un stress faible n'est peut-être pas assez stimulant pour apprendre. Dans le cas des souris 3xTg-AD shRNA DPP4, on peut voir que l'apprentissage au Barnes Maze est exactement le même que pour les souris 3xTg-AD shRNA scramble et que la courbe de gausse n'a pas un profil se rapprochant des souris 3xTg-WT (Figure 35). La lumière, situation considérée comme stressante, ne dégagerait pas une forte stimulation motivationnelle dans ces souris pour développer le sentiment d'exploration et pour trouver une échappatoire. A l'inverse, dans le cas de la piscine de Morris, le fait d'être immergée dans l'eau oblige, en quelque sorte, la souris à trouver une échappatoire et fait donc appel à sa mémoire. Il faut aussi noter que les

souris ont commencé avec le Barnes Maze puis par le Morris Water Maze. La deuxième hypothèse serait que les souris mettent un temps assez long à comprendre le principe du test de mémoire spatiale et que le niveau de difficulté n'est pas exactement identique (Ramos 2008). En ayant connaissance de ces hypothèses, l'amélioration de l'apprentissage dans le Water Maze pour les souris 3xTg-AD shRNA DPP4 semble logique mais il serait important de vérifier ces propos à travers de nouvelles expériences comportementales avec, entre autre, des modifications sur le Barnes Maze. Il serait donc favorable d'ajouter un jour d'habituation avec un stimulus sonore et une échappatoire avec un objet visible sur la table pour obliger la souris à explorer l'ensemble des trous de la table et à mieux comprendre le principe du test. Dans le cas des résultats du traitement pharmacologique, un paramètre supplémentaire est à prendre en considération : la pharmacodynamique et la pharmacocinétique de la sitagliptine (Nabeno et al. 2013; Scott 2017). En effet, de nombreuses controverses existent pour ce traitement. Plus de 80% de cette molécule reste inchangée et excrétée par les reins. De plus, son action agit à la fois dans la périphérie ainsi qu'au niveau central mais aucun article explique précisément le pourcentage exact d'assimilation de ce produit dans le SNC. Après une lecture poussée sur l'ensemble des articles publiés, nous avons décidé d'utiliser cette molécule puisqu'il montrait souvent des effets bénéfiques sur la cognition en augmentant la neurogénèse et la neuroprotection grâce à une augmentation des voies antioxydantes et anti-apoptotiques et grâce à une diminution des dysfonctions mitochondriales via GLP-1. Dans le cas de notre étude, nous voulions étudier si le traitement pharmacologique pouvait agir directement sur A β et serait l'initiateur des effets bénéfiques énoncés juste avant. De plus en 2017, le Dr Isik révèle qu'une thérapie avec la sitagliptine chez des patients à la fois diabétiques et MA, est associée à une augmentation du score MMSE avec une p value de 0.034 en comparaison au traitement avec la metformine. Un dernier article montre par immunohistochimie une baisse significative de l'A β dans des souris APP/PS1 traitées à la sitagliptine pendant 12 semaines par gavage (Isik et al. 2017). Au vu des différentes mises au point expérimentales dans les articles, nous nous sommes décidés à administrer la sitagliptine en intrapéritonéale à 15mg/kg pendant 6 semaines. Mes résultats comportementaux ne montrent pas d'amélioration cognitive significative liée au traitement (Article 2 et [Figure 36](#)). Cependant, une tendance semble se profiler dans le test du Barnes Maze avec une courbe de gausse montrant une préférence pour le trou cible ainsi que les trous voisins. Par immunohistochimie et Elisa, on a pu aussi observer une tendance à la diminution du nombre de plaques, de l'aire des plaques amyloïdes et une diminution significative de l'A β ₄₂ dans la fraction insoluble de ces souris. Pour percevoir un effet plus

frappant, il serait souhaitable d'utiliser la sitagliptine sur une durée plus longue ou d'administrer le nouveau traitement pharmacologique dirigé contre DPP4, l'omarigliptine, créé récemment pour obtenir une meilleure pharmacocinétique et une meilleure pénétration de l'inhibiteur à travers la BHE.

Malgré ces effets sur A β , il est important de noter que DPP4 a été identifiée en 1966 comme étant un antigène de surface leucocytaire nommé CD26 (cluster de différenciation) et joue un rôle dans l'inflammation via l'activation des cellules T CD4⁺ et la régulation de plusieurs chemokines telles que CCL3, CCL5 ou CXCL10 (Ohnuma et al 2008 ; Shao et al. 2020). DPP4 est une ectoenzyme, principalement présente dans les lymphocytes Th1 et Th17 et donc associée à l'activation de la voie pro-inflammatoire. DPP4 interagit aussi avec les protéines ADA, Cav1, fibronectine ou CXCR4 permettant l'activation et la migration lymphocytaire mais dans le modèle murin, il semblerait que certaines interactions ne soient pas présentes (Cordero, Yang, et Bell 2007). Au cours du vieillissement, l'expression de CD26 semble augmenter et la source majeure de production de cette enzyme est observée dans les cellules hématopoïétiques et induite transitoirement par une infection virale (Casrouge et al. 2018 ; Sakata-Kaneko et al. 2000). Dans le cas d'une infection au virus de l'hépatite C (HCV), un article révèle la présence élevée de CXCL10 tronquée par une activité soutenue de DPP4. CXCL10 tronquée semble favoriser la persistance virale et l'inhibition de l'immunité adaptative et innée en jouant comme une chemokine antagoniste (Krakauer et al, 2006; Riva et al. 2014). Dans le cas de la MA, très peu d'études analysent avec précision l'implication de DPP4 dans la neuro-inflammation présente dans la MA (Abdelsalam et Safar 2015). Dans la plupart des cas, les études montrent un effet bénéfique des inhibiteurs de DPP4 sur GLP-1, Tau, GSK3- β et sur la cognition. Cependant, malgré une lecture soutenue, aucun article à ma connaissance ne présente le mécanisme d'action de la sitagliptine au niveau cérébral et son effet sur ses chemokines et ses partenaires. Sachant que son passage à travers la BHE est toujours discuté, pourquoi ne pas supposer que les résultats améliorant la cognition ne sont pas plus en lien avec une régulation du métabolisme périphérie qu'avec le SNC. Dans mes conditions pharmacologiques, mes résultats n'infirment ou ne confirment pas cette hypothèse. Cependant, l'invalidation partielle avec les shRNAs DPP4 et la spectrométrie de masse assurent notre hypothèse d'interaction directe de DPP4 avec A β et un effet bénéfique de la diminution des formes tronquées du peptide amyloïde. Par ailleurs, l'intérêt d'étudier de manière assidue DPP4 est sans doute les liens entre les facteurs de risques (le diabète, l'obésité) avec la MA et l'inflammation (Kshirsagar et al 2020; Moyses et al. 2019). Bien entendu, la troncation du peptide amyloïde et les conséquences sur le développement de la pathologie jouent un rôle

crucial mais il me paraît encore plus utile de cibler cette enzyme en connaissant tous ses substrats. En effet, le diabète et l'obésité sont associés en partie par une dérégulation de GLP-1, de GIP et de RANTES, tous substrats de DPP4 et jouant dans l'inflammation. De plus en plus, l'inflammation chronique périphérique est démontré agir sur le développement de la MA et donc rééquilibrer l'activité de DPP4 en périphérie et dans le SNC, semble faire partie des thérapies de l'avenir pour la MA (Paouri et al. 2017).

C99, catabolite plus approprié pour l'initiation de la pathologie ?

Le C99 ou β -CTF est un catabolite de la β APP récemment étudié pour son implication précoce dans la MA. A ce jour le rôle exact de ce fragment, en conditions physiologique et pathologique, n'est pas réellement défini. A partir du clivage de la β -sécrétase, le C99 produit s'accumule pathologiquement dans la voie de dégradation, le système endosomal-lysosomal-autophagique, dans les exosomes ou est clivé par la γ -sécrétase ou d'autres enzymes entraînant entre autres, la formation de multiples A β s. Mon laboratoire d'accueil ainsi que les travaux du Dr Nixon ont montré que le C99 est associé avec les dysfonctions mitochondriales et autophagiques dans des conditions mimant la MA (I. Lauritzen et al. 2019; Inger Lauritzen et al. 2016; Nixon 2017; Vaillant-Beuchot et al. 2020). Présent et accumulé dans plusieurs compartiments cellulaires (lysosomes, endosomes, corps multi-vésiculaires...), cet encombrement interfère avec le bon fonctionnement du système de dégradation et de recyclage des protéines toxiques ou non fonctionnelles. Chez les patients MA ou dans notre modèle 3xTg-AD, le C99 est retrouvé précocement dans le cortex pré-frontal et l'hippocampe (particulièrement dans le subiculum pour le modèle murin). Les altérations affectant son élimination sont un facteur clé de sa toxicité et plusieurs arguments donnent une importance capitale au C99 dans la pathologie. En effet, nous pouvons constater que la plupart des patients FAD présentent une mutation sur la préséniline, protéine constituant le complexe γ -sécrétase. Cette enzyme est catégorisée bien entendu comme étant l'enzyme de production du peptide A β mais cette coupure représente aussi l'inactivation du fragment C99. Ne serait-ce pas une fonction trop souvent oubliée ? Surtout qu'il a clairement été montré que les inhibiteurs de la γ -sécrétase, dans des études *in vitro* ou dans des essais cliniques, augmentent le niveau du C99 et aggravent les phénotypes. De plus, dans le contexte pathologique avec les changements pH-métriques ainsi que les changements de localisation des enzymes, énoncés dans la partie A β , la production du C99 est sans aucun doute exacerbé, présente en amont du peptide amyloïde et

cause une aggravation des dysfonctions cellulaires. Par ailleurs, son effet neurotoxique découle aussi de sa capacité de propagation et de dimérisation dans le cerveau. Récemment, plusieurs études énoncent les domaines permettant au C99 de s'auto-oligomériser et même d'être présent dans les vésicules sécrétrices, les exosomes (Bourgeois et al. 2018; Y. Jiang et al. 2019 ; Lauritzen et al. 2019). Ne sachant toujours pas la fonction propre du C99 et des formes oligomériques, le dernier article publié par mon équipe sur ce sujet confirme le rôle de la γ -sécrétase et du motif GxxxG dans sa dimérisation, que C99 peut se dimériser avec le C83 ou avec lui-même et qu'ils sont présents dans les exosomes. Ces observations donnent des perspectives de compréhension sur la chronologie du développement de la pathologie et permettraient de réconcilier les hypothèses d'implication de la cascade amyloïde. Après réflexion et d'un point de vue chronologique, les déséquilibres chroniques du cholestérol, du calcium, du Zinc, du cuivre, du pH (Liu et al. 2019 ; Popugaeva et al 2018 ; Portbury et al 2017 ; Rembach et al. 2013 ; Sensi et al. 2018)... ne seraient-ils pas les initiateurs d'un changement de localisation d'enzymes et d'acidité des compartiments cellulaires entraînant une modification de la protéolyse de la β APP et une production accrue, dans un premier temps, du C99 ? Suivant cette logique, ce catabolite s'accumulerait et interfèrerait avec la voie lysosomale autophagique, ainsi que les multiples A β s. Par la suite, le C99 et le peptide amyloïde (ainsi que les formes oligomériques) se propageraient via la voie exosomale dans les cellules gliales entraînant une neuroinflammation et une aggravation de la pathologie.

Perspectives thérapeutiques

Face à la complexité de la Maladie d'Alzheimer, il n'est pas surprenant que la communauté scientifique entrevoit une thérapie « multi-cibles ». En effet, au vu de l'origine multifactorielle que présente la MA, comme évoqué dans le cadre de mon projet avec la dérégulation des substrats catalysés par les enzymes APA et DPP4, les échecs successifs de plus de 100 essais cliniques mettent en évidence le besoin de se diriger sur une médecine permettant de réguler plusieurs protéines (MTDLs : multi target-directed ligands) et d'imaginer de nouveaux modèles « intégrés ». Actuellement, seulement les inhibiteurs cholinestérases et les antagonistes des NMDAR diminuent la progression de la pathologie. Actuellement, les nouvelles avancées dénotent l'intérêt d'utiliser une stratégie « ligands multi-cibles » comme une thérapie prometteuse. Par exemple, l'oligomannate (GV-971) agirait à la fois sur A β , sur le microbiote intestinale et la neuroinflammation dans la MA (T. Wang et al. 2020). De plus,

de nombreux groupes se tournent sur des molécules hybrides où l'on peut combiner des inhibiteurs de MAO, Acétylcholine, de chélateur de métaux, de BACE ou d'A β sur le même principe actif. Cette voie thérapeutique semble être une stratégie révolutionnaire pour neutraliser la MA mais cela n'est qu'au stade précoce étant donné le challenge en terme d'optimisation du complexe structurel de la molécule pour limiter les effets secondaires et pour permettre une bonne pharmacocinétique (Iraji et al. 2020). Dans cette optique, une molécule pharmacologique inhibant partiellement l'activité enzymatique à la fois de DPP4 et d'APA, en périphérie et au niveau du système nerveux central, mais aussi en rééquilibrant la concentration des métaux, des ions calciques ou des lipides permettrait potentiellement le rétablissement d'un phénotype physiologique.

Pour valider les futures drogues en essai clinique, plusieurs chercheurs développent des organoïdes humains à partir de cellules souches dérivées formant un « mini-cerveau en 3D » (Gonzalez et al. 2018 ; King 2018). A partir de 5/6 semaines, un dépôt amyloïde apparaît, suivi de l'apparition des enchevêtrements neurofibrillaires. Toutes les caractéristiques pathologiques révèlent que les organoïdes cérébraux sont un excellent modèle pour étudier les mécanismes fondamentaux de la pathologie ainsi que pour caractériser les effets de nouvelles drogues. Les autres modèles envisagés pour recréer au mieux la MA humaine, sont l'utilisation de macaques ayant reçu du tissu de cerveaux humains (Camus et al. 2015) ou des ouistitis avec une mutation *PSENI* (délétion de l'exon 9) via la méthode TALEN. En effet en août 2020, l'équipe du Dr Saido présente le premier modèle primate non-humain présentant une altération de la PS1 et produisant une augmentation du ratio de l'A β_{42} /A β_{40} (Sato et al. 2020). L'ensemble de ces outils représente des éléments clés pour réussir à gommer les zones d'ombre sur les mécanismes pathologiques et à obtenir des inhibiteurs curatifs efficaces pour la MA.

REFERENCES

- A. Armstrong, Richard. 2019. « Risk factors for Alzheimer's disease ». *Folia Neuropathologica* 57(2): 87-105.
- Abbott, Catherine A., Geoffrey W. McCaughan, Elizabeth Baker, et Grant R. Sutherland. 1994. « Genomic Organization, Exact Localization, and Tissue Expression of the Human CD26 (Dipeptidyl Peptidase IV) Gene ». *Immunogenetics* 40(5): 331-38.
- Abdelsalam, Rania M., et Marwa M. Safar. 2015. « Neuroprotective Effects of Vildagliptin in Rat Rotenone Parkinson's Disease Model: Role of RAGE-NFκB and Nrf2-Antioxidant Signaling Pathways ». *Journal of Neurochemistry* 133(5): 700-707.
- Abraham, J-D et al. 2013. « Cerebrospinal Aβ_{11-x} and 17-x Levels as Indicators of Mild Cognitive Impairment and Patients' Stratification in Alzheimer's Disease ». *Translational Psychiatry* 3(7): e281-e281.
- Absalon, S., D. M. Kochanek, V. Raghavan, et A. M. Krichevsky. 2013. « MiR-26b, Upregulated in Alzheimer's Disease, Activates Cell Cycle Entry, Tau-Phosphorylation, and Apoptosis in Postmitotic Neurons ». *Journal of Neuroscience* 33(37): 14645-59.
- Acero, Gonzalo et al. 2020. « Novel Monoclonal Antibody 3B8 Specifically Recognizes Pyroglutamate-Modified Amyloid β 3-42 Peptide in Brain of AD Patients and 3xTg-AD Transgenic Mice ». *Neuroscience Letters* 724: 134876.
- Achilli, Cesare, Annarita Ciana, et Giampaolo Minetti. 2014. « Amyloid-Beta (25–35) Peptide Induces the Release of pro-Matrix Metalloprotease 9 (pro-MMP-9) from Human Neutrophils ». *Molecular and Cellular Biochemistry* 397(1-2): 117-23.
- Advancing Research and Treatment for Frontotemporal Lobar Degeneration (ARTFL) investigators et al. 2020. « Diagnostic Value of Plasma Phosphorylated Tau181 in Alzheimer's Disease and Frontotemporal Lobar Degeneration ». *Nature Medicine* 26(3): 387-97.
- Aguayo-Ortiz, Rodrigo, John E. Straub, et Laura Dominguez. 2018. « Influence of Membrane Lipid Composition on the Structure and Activity of γ-Secretase ». *Physical Chemistry Chemical Physics* 20(43): 27294-304.
- Aguirre, Luis A et al. 2015. « Long-Range Regulatory Interactions at the 4q25 Atrial Fibrillation Risk Locus Involve PITX2c and ENPEP ». *BMC Biology* 13(1): 26.
- Ahmad, Munirah et al. 2006. « Cleavage of Amyloid-β Precursor Protein (APP) by Membrane-Type Matrix Metalloproteinases ». *The Journal of Biochemistry* 139(3): 517-26.
- Ahn, Jae Eun et al. 2020. « Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Effects of a γ-Secretase Modulator, PF -06648671, on CSF Amyloid-β Peptides in Randomized Phase I Studies ». *Clinical Pharmacology & Therapeutics* 107(1): 211-20.
- Ahrén, Bo et al. 2007. « DPP-4 Inhibition Improves Glucose Tolerance and Increases Insulin and GLP-1 Responses to Gastric Glucose in Association with Normalized Islet Topography in Mice with

- β -Cell-Specific Overexpression of Human Islet Amyloid Polypeptide ». *Regulatory Peptides* 143(1-3): 97-103.
- Akerman, S. Can et al. 2019. « Neurodegenerative Disease-Related Proteins within the Epidermal Layer of the Human Skin ». *Journal of Alzheimer's Disease* 69(2): 463-78.
- Albensi, Benedict C. 2019. « Dysfunction of Mitochondria: Implications for Alzheimer's Disease ». In *International Review of Neurobiology*, Elsevier, 13-27.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0074774219300133> (22 avril 2020).
- Alcarráz-Vizán, Gema et al. 2017. « BACE2 Suppression Promotes β -Cell Survival and Function in a Model of Type 2 Diabetes Induced by Human Islet Amyloid Polypeptide Overexpression ». *Cellular and molecular life sciences: CMLS* 74(15): 2827-38.
- Alexandru, A. et al. 2011. « Selective Hippocampal Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Small Amounts of Truncated A Is Induced by Pyroglutamate-A Formation ». *Journal of Neuroscience* 31(36): 12790-801.
- Alexopoulos, Panagiotis et al. 2018. « Plasma Levels of Soluble Amyloid Precursor Protein β in Symptomatic Alzheimer's Disease ». *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 268(5): 519-24.
- Almansoub, Hasan A.M.M. et al. 2019. « Tau Abnormalities and the Potential Therapy in Alzheimer's Disease » éd. Ling-Qiang Zhu. *Journal of Alzheimer's Disease* 67(1): 13-33.
- Alves da Costa, Cristine et al. 2006. « Presenilin-Dependent Gamma-Secretase-Mediated Control of P53-Associated Cell Death in Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 26(23): 6377-85.
- Ancolio, K. et al. 1999. « Unusual Phenotypic Alteration of Beta Amyloid Precursor Protein (BetaAPP) Maturation by a New Val-715 --> Met BetaAPP-770 Mutation Responsible for Probable Early-Onset Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(7): 4119-24.
- Anderson, J.J. et al. 1999. « Reduced Cerebrospinal Fluid Levels of α -Secretase-Cleaved Amyloid Precursor Protein in Aged Rats: Correlation with Spatial Memory Deficits ». *Neuroscience* 93(4): 1409-20.
- Antonios, Gregory et al. 2013. « N-Truncated Abeta Starting with Position Four: Early Intraneuronal Accumulation and Rescue of Toxicity Using NT4X-167, a Novel Monoclonal Antibody ». *Acta Neuropathologica Communications* 1(1): 56.
- . 2015. « Alzheimer Therapy with an Antibody against N-Terminal Abeta 4-X and Pyroglutamate Abeta 3-X ». *Scientific Reports* 5(1).
<http://www.nature.com/articles/srep17338> (2 novembre 2018).
- Antonyan, Alvard et al. 2018. « Concerted Action of Dipeptidyl Peptidase IV and Glutaminyl Cyclase Results in Formation of Pyroglutamate-Modified Amyloid Peptides in Vitro ». *Neurochemistry International* 113: 112-19.
- Aoyagi, Takaaki et al. 1993. « Enzymatic Changes in Cerebrospinal Fluid of Patients with Alzheimer-Type Dementia. » *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition* 14(2): 133-39.

- Arendse, Lauren B. et al. 2019. « Novel Therapeutic Approaches Targeting the Renin-Angiotensin System and Associated Peptides in Hypertension and Heart Failure » éd. Eric L. Barker. *Pharmacological Reviews* 71(4): 539-70.
- Arscott, W T, A E LaBauve, V May, et U V Wesley. 2009. « Suppression of Neuroblastoma Growth by Dipeptidyl Peptidase IV: Relevance of Chemokine Regulation and Caspase Activation ». *Oncogene* 28(4): 479-91.
- Ashby, Emma L., James S. Miners, Patrick G. Kehoe, et Seth Love. 2016. « Effects of Hypertension and Anti-Hypertensive Treatment on Amyloid- β (A β) Plaque Load and A β -Synthesizing and A β -Degrading Enzymes in Frontal Cortex » éd. Francesco Panza. *Journal of Alzheimer's Disease* 50(4): 1191-1203.
- Aston-Mourney, Kathryn et al. 2013. « One Year of Sitagliptin Treatment Protects against Islet Amyloid-Associated β -Cell Loss and Does Not Induce Pancreatitis or Pancreatic Neoplasia in Mice ». *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism* 305(4): E475-84.
- Atri, Alireza. 2019. « The Alzheimer's Disease Clinical Spectrum ». *Medical Clinics of North America* 103(2): 263-93.
- Azkona, G. et al. 2010. « Characterization of a Mouse Model Overexpressing Beta-Site APP-Cleaving Enzyme 2 Reveals a New Role for BACE2 ». *Genes, Brain and Behavior* 9(2): 160-72.
- Backstrom, J. R., G. P. Lim, M. J. Cullen, et Z. A. Tökés. 1996. « Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) Is Synthesized in Neurons of the Human Hippocampus and Is Capable of Degrading the Amyloid-Beta Peptide (1-40) ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 16(24): 7910-19.
- Bag, Sudipta et al. 2016. « Hydrophobic Tail Length Plays a Pivotal Role in Amyloid Beta (25-35) Fibril-Surfactant Interactions: Nonpolarity in Fibril-Surfactant Interactions ». *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 84(9): 1213-23.
- Baglietto-Vargas, David et al. 2016. « Diabetes and Alzheimer's Disease Crosstalk ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 64: 272-87.
- Bai, Yu et al. 2008. « The *in Vivo* Brain Interactome of the Amyloid Precursor Protein ». *Molecular & Cellular Proteomics* 7(1): 15-34.
- Bailey, Antoinette R. et al. 2012. « Aberrant T-lymphocyte Development and Function in Mice Overexpressing Human Soluble Amyloid Precursor Protein- α : Implications for Autism ». *The FASEB Journal* 26(3): 1040-51.
- Baranello, Robert et al. 2015. « Amyloid-Beta Protein Clearance and Degradation (ABCD) Pathways and Their Role in Alzheimer's Disease ». *Current Alzheimer Research* 12(1): 32-46.
- Baranger, Kévin, Yannick Marchalant, et al. 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 ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 73(1): 217-36.
- Baranger, Kévin, Amandine E. Bonnet, et al. 2016. « MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking *in Vitro* ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9: 163.

- Barger, S. W. et al. 1995. « Role of Cyclic GMP in the Regulation of Neuronal Calcium and Survival by Secreted Forms of Beta-Amyloid Precursor ». *Journal of Neurochemistry* 64(5): 2087-96.
- Barritt, Joseph D., et John H. Viles. 2015. « Truncated Amyloid- β (11-40/42) from Alzheimer Disease Binds Cu^{2+} with a Femtomolar Affinity and Influences Fiber Assembly ». *Journal of Biological Chemistry* 290(46): 27791-802.
- Barritt, Joseph D., Nadine D. Younan, et John H. Viles. 2017. « N-Terminally Truncated Amyloid- β (11-40/42) Cofibrillizes with Its Full-Length Counterpart: Implications for Alzheimer's Disease ». *Angewandte Chemie International Edition* 56(33): 9816-19.
- Basurto-Islas, Gustavo et al. 2013. « Activation of Asparaginyl Endopeptidase Leads to Tau Hyperphosphorylation in Alzheimer Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 288(24): 17495-507.
- Bauer, Charlotte et al. 2011. « γ -Secretase-Mediated Regulation of Nprilysin: Influence of Cell Density and Aging and Modulation by Imatinib ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 27(3): 511-20.
- Beckenkamp, Aline, Samuel Davies, Júlia Biz Willig, et Andréia Buffon. 2016. « DPPIV/CD26: A Tumor Suppressor or a Marker of Malignancy? ». *Tumor Biology* 37(6): 7059-73.
- Becker-Pauly, Christoph, et Claus U. Pietrzik. 2017. « The Metalloprotease Meprin β Is an Alternative β -Secretase of APP ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2016.00159/full> (31 octobre 2018).
- Beckett, Caroline, Natalia N. Nalivaeva, Nikolai D. Belyaev, et Anthony J. Turner. 2012. « Nuclear Signalling by Membrane Protein Intracellular Domains: The AICD Enigma ». *Cellular Signalling* 24(2): 402-9.
- Beel, Andrew J., Masayoshi Sakakura, Paul J. Barrett, et Charles R. Sanders. 2010. « Direct Binding of Cholesterol to the Amyloid Precursor Protein: An Important Interaction in Lipid-Alzheimer's Disease Relationships? ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801(8): 975-82.
- Bello-Medina, P.C., D.A. González-Franco, I. Vargas-Rodríguez, et S. Díaz-Cintra. 2019. « Estrés oxidativo, respuesta inmune, plasticidad sináptica y cognición en modelos transgénicos de la enfermedad de Alzheimer ». *Neurología*: S0213485319301094.
- Belyaev, Nikolai D. et al. 2010. « The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a β -Secretase-Dependent Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 285(53): 41443-54.
- Belyaev, Nikolai D, Natalia N Nalivaeva, Natalia Z Makova, et Anthony J Turner. 2009. « Nprilysin Gene Expression Requires Binding of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain to Its Promoter: Implications for Alzheimer Disease ». *EMBO reports* 10(1): 94-100.
- Benek, Ondrej et al. 2018. « 1-(Benzo[d]Thiazol-2-Yl)-3-Phenylureas as Dual Inhibitors of Casein Kinase 1 and ABAD Enzymes for Treatment of Neurodegenerative Disorders ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 33(1): 665-70.
- Bennett, D. A. et al. 2006. « Neuropathology of Older Persons without Cognitive Impairment from Two Community-Based Studies ». *Neurology* 66(12): 1837-44.

- Beraldo, Flavio H. et al. 2016. « Regulation of Amyloid β Oligomer Binding to Neurons and Neurotoxicity by the Prion Protein-MGluR5 Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 291(42): 21945-55.
- Bernstein, Alison I. et al. 2016. « 5-Hydroxymethylation-Associated Epigenetic Modifiers of Alzheimer's Disease Modulate Tau-Induced Neurotoxicity ». *Human Molecular Genetics*: ddw109.
- Bernstein, Hans-Gert et al. 1987. « Immunolocalization of Dipeptidyl Aminopeptidase (DAP IV) in the Developing Human Brain ». *International Journal of Developmental Neuroscience* 5(3): 237-42.
- Bernstein, Hans-Gert, Henrik Dobrowolny, Gerburg Keilhoff, et Johann Steiner. 2018. « Dipeptidyl Peptidase IV, Which Probably Plays Important Roles in Alzheimer Disease (AD) Pathology, Is Upregulated in AD Brain Neurons and Associates with Amyloid Plaques ». *Neurochemistry International* 114: 55-57.
- Bernstein, Kenneth E. et al. 2014. « Angiotensin-Converting Enzyme Overexpression in Myelomonocytes Prevents Alzheimer's-like Cognitive Decline ». *Journal of Clinical Investigation* 124(3): 1000-1012.
- Bhattacharyya, R., C. Barren, et D. M. Kovacs. 2013. « Palmitoylation of Amyloid Precursor Protein Regulates Amyloidogenic Processing in Lipid Rafts ». *Journal of Neuroscience* 33(27): 11169-83.
- Bibl, Mirko, Marion Gallus, Volker Welge, Hermann Esselmann, et Jens Wiltfang. 2012. « Aminoterminally Truncated and Oxidized Amyloid- β Peptides in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients ». *Journal of Alzheimer's Disease* 29(4): 809-16.
- Bibl, Mirko, Marion Gallus, Volker Welge, Hermann Esselmann, Stefanie Wolf, et al. 2012. « Cerebrospinal Fluid Amyloid- β 2-42 Is Decreased in Alzheimer's, but Not in Frontotemporal Dementia ». *Journal of Neural Transmission* 119(7): 805-13.
- Bibl, Mirko, Marion Gallus, Volker Welge, Sabine Lehmann, et al. 2012. « Characterization of Cerebrospinal Fluid Aminoterminally Truncated and Oxidized Amyloid- β Peptides ». *PROTEOMICS - Clinical Applications* 6(3-4): 163-69.
- Bibl, Mirko et al. 2018. « Correction to: Cerebrospinal Fluid Amyloid- β 2-42 Is Decreased in Alzheimer's, but Not in Frontotemporal Dementia ». *Journal of Neural Transmission* 125(10): 1515-16.
- Bilkei-Gorzo, Andras. 2014. « Genetic Mouse Models of Brain Ageing and Alzheimer's Disease ». *Pharmacology & Therapeutics* 142(2): 244-57.
- Bjerke, Maria et al. 2011. « Cerebrospinal Fluid Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitor of Metalloproteinases in Combination with Subcortical and Cortical Biomarkers in Vascular Dementia and Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 27(3): 665-76.
- Blanch, Marta et al. 2016. « Altered Mitochondrial DNA Methylation Pattern in Alzheimer Disease-Related Pathology and in Parkinson Disease ». *The American Journal of Pathology* 186(2): 385-97.

- Blanco, Lorena et al. 2014. « Altered Glutamyl-Aminopeptidase Activity and Expression in Renal Neoplasms ». *BMC Cancer* 14(1): 386.
- Blenkinsop, Alexandra et al. 2020. « Non-memory Cognitive Symptom Development in Alzheimer's Disease ». *European Journal of Neurology*: ene.14185.
- Boccardi, Virginia, Ilenia Murasecco, et Patrizia Mecocci. 2019. « Diabetes Drugs in the Fight against Alzheimer's Disease ». *Ageing Research Reviews* 54: 100936.
- Boche, D. et al. 2008. « Consequence of A β Immunization on the Vasculature of Human Alzheimer's Disease Brain ». *Brain* 131(12): 3299-3310.
- Botteri, Gaia et al. 2018. « The BACE1 Product SAPP β Induces ER Stress and Inflammation and Impairs Insulin Signaling ». *Metabolism* 85: 59-75.
- Bourgade, Karine et al. 2015. « β -Amyloid Peptides Display Protective Activity against the Human Alzheimer's Disease-Associated Herpes Simplex Virus-1 ». *Biogerontology* 16(1): 85-98.
- Bourgeois, Alexandre et al. 2018. « Intraneuronal Accumulation of C99 Contributes to Synaptic Alterations, Apathy-like Behavior, and Spatial Learning Deficits in 3 \times TgAD and 2 \times TgAD Mice ». *Neurobiology of Aging* 71: 21-31.
- Bousiges, Olivier et al. 2018. « Cerebrospinal Fluid Alzheimer Biomarkers Can Be Useful for Discriminating Dementia with Lewy Bodies from Alzheimer's Disease at the Prodromal Stage ». *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 89(5): 467-75.
- Bouter, Caroline et al. 2019. « 18F-FDG-PET Detects Drastic Changes in Brain Metabolism in the Tg4+42 Model of Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 10: 425.
- Bouter, Yvonne et al. 2013. « N-Truncated Amyloid β (A β) 4-42 Forms Stable Aggregates and Induces Acute and Long-Lasting Behavioral Deficits ». *Acta Neuropathologica* 126(2): 189-205.
- Braak, H., et E. Braak. 1991. « Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes ». *Acta Neuropathologica* 82(4): 239-59.
- Braak, Heiko, Eva Braak, Inge Grundke-Iqbal, et Khalid Iqbal. 1986. « Occurrence of Neuropil Threads in the Senile Human Brain and in Alzheimer's Disease: A Third Location of Paired Helical Filaments Outside of Neurofibrillary Tangles and Neuritic Plaques ». *Neuroscience Letters* 65(3): 351-55.
- Brandan, Enrique, et Nibaldo C. Inestrosa. 1993. « Extracellular Matrix Components and Amyloid in Neuritic Plaques of Alzheimer's Disease ». *General Pharmacology: The Vascular System* 24(5): 1063-68.
- Budelier, Melissa M, et Randall J Bateman. 2020. « Biomarkers of Alzheimer Disease ». *The Journal of Applied Laboratory Medicine* 5(1): 194-208.
- Bukhari, Hassan et al. 2016. « Membrane Tethering of APP C-Terminal Fragments Is a Prerequisite for T668 Phosphorylation Preventing Nuclear Sphere Generation ». *Cellular Signalling* 28(11): 1725-34.

- — —. 2017. « Small Things Matter: Implications of APP Intracellular Domain AICD Nuclear Signaling in the Progression and Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Progress in Neurobiology* 156: 189-213.
- Buoso, Erica et al. 2012. « A β PP Intracellular C-Terminal Domain Function is Related to its Degradation Processes ». *Journal of Alzheimer's Disease* 30(2): 393-405.
- Burgos, Patricia V. et al. 2010. « Sorting of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein Mediated by the AP-4 Complex ». *Developmental Cell* 18(3): 425-36.
- Busek, P., J. Stremenová, E. Krepela, et A. Sedo. 2008. « Modulation of Substance P Signaling by Dipeptidyl Peptidase-IV Enzymatic Activity in Human Glioma Cell Lines ». *Physiological Research* 57(3): 443-49.
- Busek, Petr et al. 2012. « Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibits Glioma Cell Growth Independent of Its Enzymatic Activity ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 44(5): 738-47.
- Buxbaum, Joseph D. et al. 1998. « Evidence That Tumor Necrosis Factor α Converting Enzyme Is Involved in Regulated α -Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor ». *Journal of Biological Chemistry* 273(43): 27765-67.
- Cabrera, Erwin et al. 2018. « A β Truncated Species: Implications for Brain Clearance Mechanisms and Amyloid Plaque Deposition ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1864(1): 208-25.
- Caccamo, Antonella et al. 2006. « M1 Receptors Play a Central Role in Modulating AD-like Pathology in Transgenic Mice ». *Neuron* 49(5): 671-82.
- Cai, Zhiyou et al. 2018. « Role of Blood-Brain Barrier in Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 63(4): 1223-34.
- Caillava, Céline et al. 2014. « Study on A β 34 Biology and Detection in Transgenic Mice Brains ». *Neurobiology of Aging* 35(7): 1570-81.
- Camus, Sandrine, Wai Kin D. Ko, Elsa Pioli, et Erwan Bezard. 2015. « Why Bother Using Non-Human Primate Models of Cognitive Disorders in Translational Research? ». *Neurobiology of Learning and Memory* 124: 123-29.
- Carey, Robert M. 2013. « Newly Discovered Components and Actions of the Renin–Angiotensin System ». *Hypertension* 62(5): 818-22.
- Carmona, Susana, John Hardy, et Rita Guerreiro. 2018. « The Genetic Landscape of Alzheimer Disease ». In *Handbook of Clinical Neurology*, Elsevier, 395-408.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780444640765000260> (6 avril 2020).
- Carnevale, Daniela, Marialuisa Perrotta, Giuseppe Lembo, et Bruno Trimarco. 2016. « Pathophysiological Links Among Hypertension and Alzheimer's Disease ». *High Blood Pressure & Cardiovascular Prevention* 23(1): 3-7.
- Carpentier, Mélanie et al. 2002. « Declining Expression of Neprilysin in Alzheimer Disease Vasculature: Possible Involvement in Cerebral Amyloid Angiopathy ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 61(10): 849-56.

- Carrano, Anna et al. 2011. « Amyloid Beta Induces Oxidative Stress-Mediated Blood–Brain Barrier Changes in Capillary Amyloid Angiopathy ». *Antioxidants & Redox Signaling* 15(5): 1167-78.
- Carter, C.J. 2019. « Autism Genes and the Leukocyte Transcriptome in Autistic Toddlers Relate to Pathogen Interactomes, Infection and the Immune System. A Role for Excess Neurotrophic SAPP α and Reduced Antimicrobial A β ». *Neurochemistry International* 126: 36-58.
- Casrouge, A. et al. 2018. « Lymphocytes Are a Major Source of Circulating Soluble Dipeptidyl Peptidase 4: Circulating SDPP4 Is Derived from Lymphocytes ». *Clinical & Experimental Immunology* 194(2): 166-79.
- Castellani, Rudolph. *Molecular pathology of Alzheimer's Disease*.
- Castellano, Joseph M. et al. 2017. « Human Umbilical Cord Plasma Proteins Revitalize Hippocampal Function in Aged Mice ». *Nature* 544(7651): 488-92.
- Celarain, Naiara et al. 2016. « TREM2 Upregulation Correlates with 5-Hydroxymethylcytosine Enrichment in Alzheimer's Disease Hippocampus ». *Clinical Epigenetics* 8(1): 37.
- Chalichem, Nehru Sai Suresh, Pindiprolu S. S. Sai Kiran, et Duraiswamy Basavan. 2018. « Possible Role of DPP4 Inhibitors to Promote Hippocampal Neurogenesis in Alzheimer's Disease ». *Journal of Drug Targeting* 26(8): 670-75.
- Chapman, Robert M. et al. 2010. « Diagnosis of Alzheimer's Disease Using Neuropsychological Testing Improved by Multivariate Analyses ». *Journal of Clinical and Experimental Neuropsychology* 32(8): 793-808.
- Chasseigneaux, Stéphanie et al. 2011. « Secreted Amyloid Precursor Protein β and Secreted Amyloid Precursor Protein α Induce Axon Outgrowth in Vitro through Egr1 Signaling Pathway ». *PloS One* 6(1): e16301.
- Chasseigneaux, Stéphanie, et Bernadette Allinquant. 2012. « Functions of A β , SAPP α and SAPP β : Similarities and Differences: A β and SAPPs Functions ». *Journal of Neurochemistry* 120: 99-108.
- Checler, F. 1995. « Processing of the Beta-Amyloid Precursor Protein and Its Regulation in Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 65(4): 1431-44.
- Checler, Frédéric, Thomas Goiran, et Cristine Alves da Costa. 2017. « Presenilins at the Crossroad of a Functional Interplay between PARK2/PARKIN and PINK1 to Control Mitophagy: Implication for Neurodegenerative Diseases ». *Autophagy* 13(11): 2004-5.
- Chen, Ming et al. 2017. « APP Modulates KCC2 Expression and Function in Hippocampal GABAergic Inhibition ». *eLife* 6: e20142.
- Cheret, Cyril et al. 2013. « Bace1 and Neuregulin-1 cooperate to control formation and maintenance of muscle spindles ». *The EMBO Journal* 32(14): 2015-28.
- Choi, Hong Y. 2013. « APP interacts with LRP4 and agrin to coordinate the development of the neuromuscular junction in mice ».

- Choi, Hyunsung, Hyun Joon Chang, Myeongsang Lee, et Sungsoo Na. 2017. « Characterizing Structural Stability of Amyloid Motif Fibrils Mediated by Water Molecules ». *ChemPhysChem* 18(7): 817-27.
- Chouliaras, Leonidas et al. 2013. « Consistent Decrease in Global DNA Methylation and Hydroxymethylation in the Hippocampus of Alzheimer's Disease Patients ». *Neurobiology of Aging* 34(9): 2091-99.
- Chuang, Hui-Yu et al. 2017. « Aminopeptidase A Initiates Tumorigenesis and Enhances Tumor Cell Stemness via TWIST1 Upregulation in Colorectal Cancer ». *Oncotarget* 8(13): 21266-80.
- Cissé, M et al. 2017. « The Transcription Factor XBP1s Restores Hippocampal Synaptic Plasticity and Memory by Control of the Kalirin-7 Pathway in Alzheimer Model ». *Molecular Psychiatry* 22(11): 1562-75.
- Citron, M. et al. 1992. « Mutation of the Beta-Amyloid Precursor Protein in Familial Alzheimer's Disease Increases Beta-Protein Production ». *Nature* 360(6405): 672-74.
- . 1994. « Excessive Production of Amyloid Beta-Protein by Peripheral Cells of Symptomatic and Presymptomatic Patients Carrying the Swedish Familial Alzheimer Disease Mutation. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(25): 11993-97.
- Citron, M et al. 1996. « Inhibition of Amyloid β -Protein Production in Neural Cells by the Serine Protease Inhibitor AEBSF ». *Neuron* 17(1): 171-79.
- Cline, Erika N., Maíra Assunção Bicca, Kirsten L. Viola, et William L. Klein. 2018. « The Amyloid- β Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade » éd. G. Perry et al. *Journal of Alzheimer's Disease* 64(s1): S567-610.
- Colacurcio, Daniel J., Anna Pensalfini, Ying Jiang, et Ralph A. Nixon. 2018. « Dysfunction of Autophagy and Endosomal-Lysosomal Pathways: Roles in Pathogenesis of Down Syndrome and Alzheimer's Disease ». *Free Radical Biology and Medicine* 114: 40-51.
- Condic, Mateja et al. 2014. « N-Truncation and Pyroglutamylation Enhances the Opsonizing Capacity of A β -Peptides and Facilitates Phagocytosis by Macrophages and Microglia ». *Brain, Behavior, and Immunity* 41: 116-25.
- Cong, Lin, et Jianping Jia. 2011. « Promoter Polymorphisms Which Regulate ADAM9 Transcription Are Protective against Sporadic Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 32(1): 54-62.
- Congdon, Erin E., et Einar M. Sigurdsson. 2018. « Tau-Targeting Therapies for Alzheimer Disease ». *Nature Reviews. Neurology* 14(7): 399-415.
- Corbett, Nicola J., et Nigel M. Hooper. 2018. « Soluble Amyloid Precursor Protein α : Friend or Foe? » In *Biochemical and Biophysical Roles of Cell Surface Molecules*, Advances in Experimental Medicine and Biology, éd. Kausik Chattopadhyay et Subhash C. Basu. Singapore: Springer Singapore, 177-83. http://link.springer.com/10.1007/978-981-13-3065-0_13 (27 avril 2020).
- Corder, E. et al. 1993. « Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families ». *Science* 261(5123): 921-23.
- Cordero, Oscar J., Chun-Ping Yang, et Eric B. Bell. 2007. « On the Role of CD26 in CD4 Memory T Cells ». *Immunobiology* 212(2): 85-94.

- Cossec, Jack-Christophe et al. 2010. « Clathrin-Dependent APP Endocytosis and A β Secretion Are Highly Sensitive to the Level of Plasma Membrane Cholesterol ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1801(8): 846-52.
- Couvineau, Pierre et al. 2017. « Involvement of Arginine 878 Together with Ca²⁺ in Mouse Aminopeptidase A Substrate Specificity for N-Terminal Acidic Amino-Acid Residues » éd. Eugene A. Permyakov. *PLOS ONE* 12(9): e0184237.
- Crehan, Helen et al. 2020. « Effector Function of Anti-Pyroglutamate-3 A β Antibodies Affects Cognitive Benefit, Glial Activation and Amyloid Clearance in Alzheimer's-like Mice ». *Alzheimer's Research & Therapy* 12(1): 12.
- Cruz, J. C. et al. 2006. « P25/Cyclin-Dependent Kinase 5 Induces Production and Intraneuronal Accumulation of Amyloid Beta In Vivo ». *Journal of Neuroscience* 26(41): 10536-41.
- Cuestas Torres, Diana Marcela, et Fernando P. Cardenas. 2020. « Synaptic plasticity in Alzheimer's disease and healthy aging ». *Reviews in the Neurosciences* 31(3): 245-68.
- Cummings, Jeffrey et al. 2017. « Alzheimer's Disease Drug Development Pipeline: 2017 ». *Alzheimer's & Dementia: Translational Research & Clinical Interventions* 3(3): 367-84.
- Cummings, Jeffrey, Howard H. Feldman, et Philip Scheltens. 2019. « The "Rights" of Precision Drug Development for Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's Research & Therapy* 11(1): 76.
- Cynis, Holger et al. 2008. « Amyloidogenic Processing of Amyloid Precursor Protein: Evidence of a Pivotal Role of Glutaminyl Cyclase in Generation of Pyroglutamate-Modified Amyloid- β ⁺ ». *Biochemistry* 47(28): 7405-13.
- D'amico, Maria Angela et al. 2014. « Biological function and clinical relevance of chromogranin A and derived peptides ». *Endocrine Connections* 3(2): R45-54.
- D'Amico, Michele et al. 2010. « Long-Term Inhibition of Dipeptidyl Peptidase-4 in Alzheimer's Prone Mice ». *Experimental Gerontology* 45(3): 202-7.
- Dammers, C., M. Schwarten, A. K. Buell, et D. Willbold. 2017. « Pyroglutamate-Modified A β (3-42) Affects Aggregation Kinetics of A β (1-42) by Accelerating Primary and Secondary Pathways ». *Chemical Science* 8(7): 4996-5004.
- Dar, Nawab John, et Gordon W. Glazner. 2020. « Deciphering the Neuroprotective and Neurogenic Potential of Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha (SAPP α) ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 77(12): 2315-30.
- Daria, Anna et al. 2017. « Young Microglia Restore Amyloid Plaque Clearance of Aged Microglia ». *The EMBO journal* 36(5): 583-603.
- D'Arrigo, Cristina, Massimo Tabaton, et Angelo Perico. 2009. « N-Terminal Truncated Pyroglutamyl β Amyloid Peptide A β Py 3-42 Shows a Faster Aggregation Kinetics than the Full-Length A β 1-42 ». *Biopolymers* 91(10): 861-73.
- David, Christelle et al. 1999. « Investigation of Subsite Preferences in Aminopeptidase A (EC 3.4.11.7) Led to the Design of the First Highly Potent and Selective Inhibitors of This Enzyme ». *Journal of Medicinal Chemistry* 42(25): 5197-5211.

- Dawkins, Edgar, et David H. Small. 2014. « Insights into the Physiological Function of the β -Amyloid Precursor Protein: Beyond Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 129(5): 756-69.
- Dawson, G.R et al. 1999. « Age-Related Cognitive Deficits, Impaired Long-Term Potentiation and Reduction in Synaptic Marker Density in Mice Lacking the β -Amyloid Precursor Protein ». *Neuroscience* 90(1): 1-13.
- De Jager, Philip L et al. 2014. « Alzheimer's Disease: Early Alterations in Brain DNA Methylation at ANK1, BIN1, RHBDF2 and Other Loci ». *Nature Neuroscience* 17(9): 1156-63.
- De Kimpe, Line et al. 2012. « Disturbed Ca^{2+} Homeostasis Increases Glutaminyl Cyclase Expression; Connecting Two Early Pathogenic Events in Alzheimer's Disease In Vitro » éd. Koichi M. Iijima. *PLoS ONE* 7(9): e44674.
- . 2013. « Intracellular Accumulation of Aggregated Pyroglutamate Amyloid Beta: Convergence of Aging and $\text{A}\beta$ Pathology at the Lysosome ». *AGE* 35(3): 673-87.
- De Strooper, B., T. Iwatsubo, et M. S. Wolfe. 2012. « Presenilins and γ -Secretase: Structure, Function, and Role in Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(1): a006304-a006304.
- De Strooper, Bart et al. 1998. « Deficiency of Presenilin-1 Inhibits the Normal Cleavage of Amyloid Precursor Protein ». *Nature* 391(6665): 387-90.
- . 2003. « Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active γ -Secretase Complex ». *Neuron* 38(1): 9-12.
- De Strooper, Bart, et Wim Annaert. 2010. « Novel Research Horizons for Presenilins and γ -Secretases in Cell Biology and Disease ». *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 26(1): 235-60.
- Deane, R., R. Bell, A. Sagare, et B. Zlokovic. 2009. « Clearance of Amyloid- β Peptide Across the Blood-Brain Barrier: Implication for Therapies in Alzheimers Disease ». *CNS & Neurological Disorders - Drug Targets* 8(1): 16-30.
- Deane, Rashid et al. 2008. « ApoE Isoform-Specific Disruption of Amyloid β Peptide Clearance from Mouse Brain ». *Journal of Clinical Investigation* 118(12): 4002-13.
- Decock, Marie et al. 2016. « Glycines from the APP GXXXG/GXXXA Transmembrane Motifs Promote Formation of Pathogenic $\text{A}\beta$ Oligomers in Cells ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 8. <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnagi.2016.00107/abstract> (2 novembre 2018).
- Del Prete, Dolores et al. 2017. « Localization and Processing of the Amyloid- β Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes ». *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 55(4): 1549-70.
- DeMattos, Ronald B. et al. 2012. « A Plaque-Specific Antibody Clears Existing β -Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Mice ». *Neuron* 76(5): 908-20.
- Deng, Juan et al. 2015. « Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha Inhibits Tau Phosphorylation through Modulation of GSK3 β Signaling Pathway ». *Journal of Neurochemistry* 135(3): 630-37.

- Deng, Yu 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 ». *European Journal of Neuroscience* 37(12): 1962-69.
- Derouesne, C. et al. 1999. « [Mini-Mental State Examination:a useful method for the evaluation of the cognitive status of patients by the clinician. Consensual French version] ». *Presse Medicale (Paris, France: 1983)* 28(21): 1141-48.
- Deyts, Carole, Gopal Thinakaran, et Angèle T. Parent. 2016. « APP Receptor? To Be or Not To Be ». *Trends in Pharmacological Sciences* 37(5): 390-411.
- Di Paolo, Gilbert, et Tae-Wan Kim. 2011. « Linking Lipids to Alzheimer's Disease: Cholesterol and Beyond ». *Nature Reviews Neuroscience* 12(5): 284-96.
- DiChiara, Thomas et al. 2017. « Alzheimer's Toxic Amyloid Beta Oligomers: Unwelcome Visitors to the Na/K ATPase Alpha3 Docking Station ». *The Yale Journal of Biology and Medicine* 90(1): 45-61.
- Dickson, Dennis W. 1997. « The Pathogenesis of Senile Plaques ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56(4): 321-39.
- Dietrich, Katharina, Yvonne Bouter, Michael Müller, et Thomas Bayer. 2018. « Synaptic Alterations in Mouse Models for Alzheimer Disease—A Special Focus on N-Truncated A β 4-42 ». *Molecules* 23(4): 718.
- Dijkman, Henry B.P.M., Karel J.M. Assmann, Eric J. Steenbergen, et Jack F.M. Wetzels. 2006. « Expression and Effect of Inhibition of Aminopeptidase-A during Nephrogenesis ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 54(2): 253-62.
- Dilsizoglu Senol, Aysegul et al. 2019. « Protein Interacting with Amyloid Precursor Protein Tail-1 (PAT1) Is Involved in Early Endocytosis ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(24): 4995-5009.
- Dinamarca, Margarita C. et al. 2019. « Complex Formation of APP with GABAB Receptors Links Axonal Trafficking to Amyloidogenic Processing ». *Nature Communications* 10(1): 1331.
- Dislich, Bastian et al. 2015. « Label-Free Quantitative Proteomics of Mouse Cerebrospinal Fluid Detects β -Site APP Cleaving Enzyme (BACE1) Protease Substrates In Vivo ». *Molecular & cellular proteomics: MCP* 14(10): 2550-63.
- Dityatev, Alexander, Constanze I. Seidenbecher, et Melitta Schachner. 2010. « Compartmentalization from the Outside: The Extracellular Matrix and Functional Microdomains in the Brain ». *Trends in Neurosciences* 33(11): 503-12.
- Dominguez, Laura, Stephen C. Meredith, John E. Straub, et David Thirumalai. 2014. « Transmembrane Fragment Structures of Amyloid Precursor Protein Depend on Membrane Surface Curvature ». *Journal of the American Chemical Society* 136(3): 854-57.
- Dong, Jian W. et al. 2020. « Diffusion MRI Biomarkers of White Matter Microstructure Vary Nonmonotonically with Increasing Cerebral Amyloid Deposition ». *Neurobiology of Aging* 89: 118-28.

- Dorostkar, Mario M., Chengyu Zou, Lidia Blazquez-Llorca, et Jochen Herms. 2015. « Analyzing Dendritic Spine Pathology in Alzheimer's Disease: Problems and Opportunities ». *Acta Neuropathologica* 130(1): 1-19.
- Doshina, Anna et al. 2017. « Cortical Cells Reveal APP as a New Player in the Regulation of GABAergic Neurotransmission ». *Scientific Reports* 7(1): 370.
- Dovey, H. F. et al. 2009. « Functional Gamma-Secretase Inhibitors Reduce Beta-Amyloid Peptide Levels in Brain: γ -Secretase Inhibitors Reduce A β Levels in PDAPP Mouse Brain ». *Journal of Neurochemistry* 76(1): 173-81.
- Dubois, Bruno et al. 2007. « Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease: Revising the NINCDS-ADRDA Criteria ». *The Lancet. Neurology* 6(8): 734-46.
- . 2010. « Revising the Definition of Alzheimer's Disease: A New Lexicon ». *The Lancet Neurology* 9(11): 1118-27.
- . 2014. « Advancing Research Diagnostic Criteria for Alzheimer's Disease: The IWG-2 Criteria ». *The Lancet Neurology* 13(6): 614-29.
- Duggan, Stephen P., et Justin V. McCarthy. 2016. « Beyond γ -Secretase Activity: The Multifunctional Nature of Presenilins in Cell Signalling Pathways ». *Cellular Signalling* 28(1): 1-11.
- Duncan, Thomas, et Michael Valenzuela. 2017. « Alzheimer's Disease, Dementia, and Stem Cell Therapy ». *Stem Cell Research & Therapy* 8(1): 111.
- Dunkelmann, Tina et al. 2018. « A β Oligomer Eliminating Compounds Interfere Successfully with PEA β (3–42) Induced Motor Neurodegenerative Phenotype in Transgenic Mice ». *Neuropeptides* 67: 27-35.
- Dunys, J. et al. 2009. « P53-Dependent Control of Transactivation of the Pen2 Promoter by Presenilins ». *Journal of Cell Science* 122(21): 4003-8.
- Dunys, Julie et al. 2007. « P53-Dependent Aph-1 and Pen-2 Anti-Apoptotic Phenotype Requires the Integrity of the Gamma-Secretase Complex but Is Independent of Its Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 282(14): 10516-25.
- Dunys, Julie, Audrey Valverde, et Frédéric Checler. 2018. « Are N- and C-Terminally Truncated A β Species Key Pathological Triggers in Alzheimer's Disease? ». *Journal of Biological Chemistry* 293(40): 15419-28.
- Duyckaerts, Charles, Benoît Delatour, et Marie-Claude Potier. 2009. « Classification and Basic Pathology of Alzheimer Disease ». *Acta Neuropathologica* 118(1): 5-36.
- Eanes, E. D., et G. G. Glenner. 1968. « X-RAY DIFFRACTION STUDIES ON AMYLOID FILAMENTS ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 16(11): 673-77.
- Eckman, Elizabeth A., Dana Kim Reed, et Christopher B. Eckman. 2001. « Degradation of the Alzheimer's Amyloid β Peptide by Endothelin-Converting Enzyme ». *Journal of Biological Chemistry* 276(27): 24540-48.

- Enz, Njanja, Gwendolyn Vliegen, Ingrid De Meester, et Wolfgang Jungraithmayr. 2019. « CD26/DPP4 - a Potential Biomarker and Target for Cancer Therapy ». *Pharmacology & Therapeutics* 198: 135-59.
- European Alzheimer's Disease Initiative (EADI) et al. 2013. « Meta-Analysis of 74,046 Individuals Identifies 11 New Susceptibility Loci for Alzheimer's Disease ». *Nature Genetics* 45(12): 1452-58.
- Evangelisti, Elisa et al. 2013. « Lipid Rafts Mediate Amyloid-Induced Calcium Dyshomeostasis and Oxidative Stress in Alzheimer's Disease ». *Current Alzheimer Research* 10(2): 143-53.
- Expertise, Collective. 2007. *Maladie Alzheimer Enjeux scientifiques, médicaux et sociétaux*. Inserm.
- Fedeli, Chiara et al. 2019. « PSEN2 (Presenilin 2) Mutants Linked to Familial Alzheimer Disease Impair Autophagy by Altering Ca²⁺ Homeostasis ». *Autophagy* 15(12): 2044-62.
- Feliciano, Andrea et al. 2013. « MiR-125b Acts as a Tumor Suppressor in Breast Tumorigenesis via Its Novel Direct Targets ENPEP, CK2- α , CCNJ, and MEGF9 » éd. Bernard Mari. *PLoS ONE* 8(10): e76247.
- Ferguson, Amy et al. 2020. *Alzheimer's Disease Susceptibility Gene Apolipoprotein e (APOE) and Blood Biomarkers in UK Biobank (N=395,769)*. Genetic and Genomic Medicine. preprint. <http://medrxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.02.12.20021998> (15 avril 2020).
- Feygina, E. E., A. G. Katrukha, et A. G. Semenov. 2019. « Neutral Endopeptidase (Nepriylsin) in Therapy and Diagnostics: Yin and Yang ». *Biochemistry (Moscow)* 84(11): 1346-58.
- Feyt, Christine et al. 2007. « Phosphorylation of APP695 at Thr668 Decreases γ -Cleavage and Extracellular A β ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 357(4): 1004-10.
- Fischer, W. H., et J. Spiess. 1987. « Identification of a Mammalian Glutaminyl Cyclase Converting Glutaminyl into Pyroglutamyl Peptides. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 84(11): 3628-32.
- Flammang, Brice et al. 2012. « Evidence that the Amyloid- β Protein Precursor Intracellular Domain, AICD, Derives From β -Secretase-Generated C-Terminal Fragment ». *Journal of Alzheimer's Disease* 30(1): 145-53.
- Flatt, Peter R., Clifford J. Bailey, et Brian D. Green. 2008. « Dipeptidyl Peptidase IV (DPP IV) and Related Molecules in Type 2 Diabetes ». *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* 13: 3648-60.
- Fluhrer, Regina et al. 2002. « A Non-Amyloidogenic Function of BACE-2 in the Secretory Pathway: Distinct BAPP Cleavage by BACE-1 and BACE-2 ». *Journal of Neurochemistry* 81(5): 1011-20.
- . 2003. « Identification of a β -Secretase Activity, Which Truncates Amyloid β -Peptide after Its Presenilin-Dependent Generation ». *Journal of Biological Chemistry* 278(8): 5531-38.
- Fol, Romain et al. 2016. « Viral Gene Transfer of APPs α Rescues Synaptic Failure in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *Acta Neuropathologica* 131(2): 247-66.
- Folch, J. et al. 2018. « Review of the Advances in Treatment for Alzheimer Disease: Strategies for Combating β -Amyloid Protein ». *Neurologia (Barcelona, Spain)* 33(1): 47-58.

- Folstein, M. F., S. E. Folstein, et P. R. McHugh. 1975. « "Mini-Mental State". A Practical Method for Grading the Cognitive State of Patients for the Clinician ». *Journal of Psychiatric Research* 12(3): 189-98.
- « Fondation Alzheimer ». <https://www.fondation-alzheimer.org/actualites/maladie-dalzheimer-les-chiffres-cles/>.
- « France Alzheimer ». <https://www.francealzheimer.org/maladie-dalzheimer-vos-questions-nos-reponses/maladie-dalzheimer-chiffres/>.
- Frisoni, Giovanni B., Bengt Winblad, et John T. O'Brien. 2011. « Revised NIA-AA Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease: A Step Forward but Not yet Ready for Widespread Clinical Use ». *International Psychogeriatrics* 23(8): 1191-96.
- Fukumori, Akio, Lukas P. Feilen, et Harald Steiner. 2020. « Substrate Recruitment by γ -Secretase ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*: S1084952118302714.
- Funamoto, Satoru et al. 2013. « Substrate Ectodomain Is Critical for Substrate Preference and Inhibition of γ -Secretase ». *Nature Communications* 4(1): 2529.
- Galvan, V. et al. 2006. « Reversal of Alzheimer's-like Pathology and Behavior in Human APP Transgenic Mice by Mutation of Asp664 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103(18): 7130-35.
- Galvão, Fernando et al. 2019. « The Amyloid Precursor Protein (APP) Processing as a Biological Link between Alzheimer's Disease and Cancer ». *Ageing Research Reviews* 49: 83-91.
- Gao, Ji et al. 2014. « A New Strategy for Treating Hypertension by Blocking the Activity of the Brain Renin–Angiotensin System with Aminopeptidase A Inhibitors ». *Clinical Science* 127(3): 135-48.
- Gao, Yu, Lin Tan, Jin-Tai Yu, et Lan Tan. 2018. « Tau in Alzheimer's Disease: Mechanisms and Therapeutic Strategies ». *Current Alzheimer Research* 15(3).
<http://www.eurekaselect.com/151650/article> (21 avril 2020).
- Garcia-Esparcia, Paula et al. 2018. « Glutamate Transporter GLT1 Expression in Alzheimer Disease and Dementia With Lewy Bodies ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 10: 122.
- Gard, Paul Richard et al. 2017. « Changes of Renin-Angiotensin System-Related Aminopeptidases in Early Stage Alzheimer's Disease ». *Experimental Gerontology* 89: 1-7.
- Gentier, Romina J. G. et al. 2015. « Localization of mutant ubiquitin in the brain of a transgenic mouse line with proteasomal inhibition and its validation at specific sites in Alzheimer's disease ». *Frontiers in Neuroanatomy* 9.
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fnana.2015.00026/abstract> (30 août 2020).
- Georganopoulou, D. G. et al. 2005. « From The Cover: Nanoparticle-Based Detection in Cerebral Spinal Fluid of a Soluble Pathogenic Biomarker for Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102(7): 2273-76.
- Georganopoulou, Dimitra G. et al. 2005. « Nanoparticle-Based Detection in Cerebral Spinal Fluid of a Soluble Pathogenic Biomarker for Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(7): 2273-76.

- Gerakis, Yannis, Julie Dunys, Charlotte Bauer, et Frédéric Checler. 2016. « A β 42 Oligomers Modulate β -Secretase through an XBP-1s-Dependent Pathway Involving HRD1 ». *Scientific Reports* 6: 37436.
- Gersbacher, Manuel T. et al. 2013. « Turnover of Amyloid Precursor Protein Family Members Determines Their Nuclear Signaling Capability ». *PLoS One* 8(7): e69363.
- Gillman, Alan L. et al. 2014. « Activity and Architecture of Pyroglutamate-Modified Amyloid- β (A β _{pE3-42}) Pores ». *The Journal of Physical Chemistry B* 118(26): 7335-44.
- Giorgetti, Sofia, Claudio Greco, Paolo Tortora, et Francesco Aprile. 2018. « Targeting Amyloid Aggregation: An Overview of Strategies and Mechanisms ». *International Journal of Molecular Sciences* 19(9): 2677.
- Giri, Mohan, Yang Lü, et Man Zhang. 2016. « Genes Associated with Alzheimer's Disease: An Overview and Current Status ». *Clinical Interventions in Aging*: 665.
- Glenner, George G., et Caine W. Wong. 1984a. « Alzheimer's Disease and Down's Syndrome: Sharing of a Unique Cerebrovascular Amyloid Fibril Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 122(3): 1131-35.
- . 1984b. « Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120(3): 885-90.
- Glorie, Lorenzo, Patrick C. D'Haese, et Anja Verhulst. 2016. « Boning up on DPP4, DPP4 Substrates, and DPP4-Adipokine Interactions: Logical Reasoning and Known Facts about Bone Related Effects of DPP4 Inhibitors ». *Bone* 92: 37-49.
- Goate, Alison et al. 1991. « Segregation of a Missense Mutation in the Amyloid Precursor Protein Gene with Familial Alzheimer's Disease ». *Nature* 349(6311): 704-6.
- Goiran, Thomas et al. 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 ». *Biological Psychiatry* 83(5): 416-27.
- Gonzalez, Cesar et al. 2018. « Modeling Amyloid Beta and Tau Pathology in Human Cerebral Organoids ». *Molecular Psychiatry* 23(12): 2363-74.
- Goodger, Z. V. et al. 2009. « Nuclear Signaling by the APP Intracellular Domain Occurs Predominantly through the Amyloidogenic Processing Pathway ». *Journal of Cell Science* 122(20): 3703-14.
- Gooz, Monika. 2010. « ADAM-17: The Enzyme That Does It All ». *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 45(2): 146-69.
- Goto, Yoshikuni et al. 2006. « Enzymatic Properties of Human Aminopeptidase A: REGULATION OF ITS ENZYMATIC ACTIVITY BY CALCIUM AND ANGIOTENSIN IV ». *Journal of Biological Chemistry* 281(33): 23503-13.
- Gouras, Gunnar K., Claudia G. Almeida, et Reisuke H. Takahashi. 2005. « Intraneuronal A β Accumulation and Origin of Plaques in Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 26(9): 1235-44.

- Green, Colin, James Shearer, Craig W. Ritchie, et John P. Zajicek. 2011. « Model-Based Economic Evaluation in Alzheimer's Disease: A Review of the Methods Available to Model Alzheimer's Disease Progression ». *Value in Health* 14(5): 621-30.
- Greenfield's Neuropathology*. 2 Seth Love, Arie Perry, James Ironside et Herbert Budka. https://books.google.fr/books?id=y4V7DwAAQBAJ&pg=PA874&dq=amyloid+lake-like+diffus+fleecy+core+cotton+wool&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwjx3aKxl_oAhXtAGMBHRWzBY4Q6AEIKTAA#v=snippet&q=compact&f=false.
- Grimm, Marcus O. W. et al. 2013. « Neprilysin and A β Clearance: Impact of the APP Intracellular Domain in NEP Regulation and Implications in Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 5. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2013.00098/abstract> (17 juin 2020).
- Grosas, Aidan B. et al. 2014. « The Tachykinin Peptide Neurokinin B Binds Copper(I) and Silver(I) and Undergoes Quasi-Reversible Electrochemistry: Towards a New Function for the Peptide in the Brain ». *Neurochemistry International* 70: 1-9.
- Grundke-Iqbal, I. et al. 1986. « Abnormal Phosphorylation of the Microtubule-Associated Protein Tau (Tau) in Alzheimer Cytoskeletal Pathology. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83(13): 4913-17.
- Grünfeld, Jp. 1992. « De l'amylose aux amyloses ». *médecine/sciences* 8(6): 522.
- « Guide du HAS ». https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2012-01/reco2clics_maladie_d_alzheimer_et_maladies_apparentees_diagnostic_et_prise_en_charge_2012-01-16_14-17-37_906.pdf.
- Guimas Almeida, Cláudia, Farzaneh Sadat Mirfakhar, Catarina Perdigão, et Tatiana Burrinha. 2018. « Impact of Late-Onset Alzheimer's Genetic Risk Factors on Beta-Amyloid Endocytic Production ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(14): 2577-89.
- Gunn, Adam P. et al. 2016. « Amyloid- β Peptide A β 3pE-42 Induces Lipid Peroxidation, Membrane Permeabilization, and Calcium Influx in Neurons ». *The Journal of Biological Chemistry* 291(12): 6134-45.
- . 2020. « Increased Glutaminy Cyclase Activity in Brains of Alzheimer's Disease Individuals ». *Journal of Neurochemistry*: jnc.15114.
- Güntert, A., H. Döbeli, et B. Bohrmann. 2006. « High Sensitivity Analysis of Amyloid-Beta Peptide Composition in Amyloid Deposits from Human and PS2APP Mouse Brain ». *Neuroscience* 143(2): 461-75.
- Guo, Qinxin et al. 2012. « APP Physiological and Pathophysiological Functions: Insights from Animal Models ». *Cell Research* 22(1): 78-89.
- Guyant-Maréchal, L., D. Champion, et D. Hannequin. 2009. « Génétique de la maladie d'Alzheimer : formes autosomiques dominantes ». *Revue Neurologique* 165(3): 223-31.
- Haapasalo, Annakaisa, et Dora M. Kovacs. 2011. « The Many Substrates of Presenilin/ γ -Secretase ». *Journal of Alzheimer's Disease* 25(1): 3-28.

- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran, et S. Sisodia. 2012. « Trafficking and Proteolytic Processing of APP ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(5): a006270-a006270.
- Haass, Christian et al. 1993. « Normal Cellular Processing of the β -Amyloid Precursor Protein Results in the Secretion of the Amyloid β Peptide and Related Molecules ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 695(1): 109-16.
- Habib, Ahsan, Darrell Sawmiller, et Jun Tan. 2017. « Restoring Soluble Amyloid Precursor Protein α Functions as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease: SAPP α as a Potential Treatment for AD ». *Journal of Neuroscience Research* 95(4): 973-91.
- Hafez, Daniel et al. 2011. « Nephilysin-2 Is an Important β -Amyloid Degrading Enzyme ». *The American Journal of Pathology* 178(1): 306-12.
- Hampel, Harald et al. 2018. « The Cholinergic System in the Pathophysiology and Treatment of Alzheimer's Disease ». *Brain* 141(7): 1917-33.
- Hansen, David V., Jesse E. Hanson, et Morgan Sheng. 2018. « Microglia in Alzheimer's Disease ». *Journal of Cell Biology* 217(2): 459-72.
- Hardy, John. 2017. « The Discovery of Alzheimer-causing Mutations in the APP Gene and the Formulation of the "Amyloid Cascade Hypothesis" ». *The FEBS Journal* 284(7): 1040-44.
- Harigaya, Yasuo et al. 2000. « Amyloid β Protein Starting Pyroglutamate at Position 3 Is a Major Component of the Amyloid Deposits in the Alzheimer's Disease Brain ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276(2): 422-27.
- Hartz, Anika M.S. et al. 2012. « Amyloid- β Contributes to Blood-Brain Barrier Leakage in Transgenic Human Amyloid Precursor Protein Mice and in Humans With Cerebral Amyloid Angiopathy ». *Stroke* 43(2): 514-23.
- Hascup, Kevin N., et Erin R. Hascup. 2016. « Soluble Amyloid- β 42 Stimulates Glutamate Release through Activation of the α 7 Nicotinic Acetylcholine Receptor » éd. D. Allan Butterfield. *Journal of Alzheimer's Disease* 53(1): 337-47.
- Hasebe, Noriko et al. 2013. « Soluble β -Amyloid Precursor Protein Alpha Binds to P75 Neurotrophin Receptor to Promote Neurite Outgrowth ». *PLoS One* 8(12): e82321.
- Hayes, Jasmeet P., Jena N. Moody, Juan Guzmán Roca, et Scott M. Hayes. 2020. « Body Mass Index Is Associated with Smaller Medial Temporal Lobe Volume in Those at Risk for Alzheimer's Disease ». *NeuroImage: Clinical* 25: 102156.
- He, Wanxia, Jinxuan Hu, Yuxing Xia, et Riqiang Yan. 2014. « β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 (BACE1) Regulates Notch Signaling by Controlling the Cleavage of Jagged 1 (Jag1) and Jagged 2 (Jag2) Proteins ». *The Journal of Biological Chemistry* 289(30): 20630-37.
- He, Zhuohao et al. 2018. « Amyloid- β Plaques Enhance Alzheimer's Brain Tau-Seeded Pathologies by Facilitating Neuritic Plaque Tau Aggregation ». *Nature Medicine* 24(1): 29-38.
- Hebert, S. S. et al. 2008. « Loss of MicroRNA Cluster MiR-29a/b-1 in Sporadic Alzheimer's Disease Correlates with Increased BACE1/ -Secretase Expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105(17): 6415-20.

- Helle, K. B., A. Corti, M.-H. Metz-Boutigue, et B. Tota. 2007. « The Endocrine Role for Chromogranin A: A Prohormone for Peptides with Regulatory Properties ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 64(22): 2863-86.
- Heppner, Frank L., Richard M. Ransohoff, et Burkhard Becher. 2015. « Immune Attack: The Role of Inflammation in Alzheimer Disease ». *Nature Reviews Neuroscience* 16(6): 358-72.
- Herms, Jochen, et Mario M. Dorostkar. 2016. « Dendritic Spine Pathology in Neurodegenerative Diseases ». *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* 11(1): 221-50.
- Hernandez-Guillamon, Mar et al. 2015. « Sequential Amyloid- β Degradation by the Matrix Metalloproteases MMP-2 and MMP-9 ». *Journal of Biological Chemistry* 290(24): 15078-91.
- Hesse, Raphael et al. 2018. « SAPP β and SAPP α Increase Structural Complexity and E/I Input Ratio in Primary Hippocampal Neurons and Alter Ca²⁺ Homeostasis and CREB1-Signaling ». *Experimental Neurology* 304: 1-13.
- de Heus, Rianne A.A. et al. 2019. « Blood Pressure Variability and Progression of Clinical Alzheimer Disease ». *Hypertension* 74(5): 1172-80.
- Hibar, Derrek P. et al. 2017. « Novel Genetic Loci Associated with Hippocampal Volume ». *Nature Communications* 8(1): 13624.
- Higashi, Shouichi, et Kaoru Miyazaki. 2003. « Novel Processing of β -Amyloid Precursor Protein Catalyzed by Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Releases a Fragment Lacking the Inhibitor Domain against Gelatinase A⁺ ». *Biochemistry* 42(21): 6514-26.
- Hinteregger, Barbara et al. 2020. « Transgene Integration Causes RARB Downregulation in Homozygous Tg4-42 Mice ». *Scientific Reports* 10(1): 6377.
- Ho, A., X. Liu, et T. C. Sudhof. 2008. « Deletion of Mint Proteins Decreases Amyloid Production in Transgenic Mouse Models of Alzheimer's Disease ». *Journal of Neuroscience* 28(53): 14392-400.
- Ho, A., et T. C. Sudhof. 2004. « Binding of F-Spondin to Amyloid- Precursor Protein: A Candidate Amyloid- Precursor Protein Ligand That Modulates Amyloid- Precursor Protein Cleavage ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(8): 2548-53.
- Hoe, H.-S. et al. 2007. « The Metalloprotease Inhibitor TIMP-3 Regulates Amyloid Precursor Protein and Apolipoprotein E Receptor Proteolysis ». *Journal of Neuroscience* 27(40): 10895-905.
- . 2009. « Interaction of Reelin with Amyloid Precursor Protein Promotes Neurite Outgrowth ». *Journal of Neuroscience* 29(23): 7459-73.
- Hoffmann, Torsten et al. 2017. « Glutaminyl Cyclase Inhibitor PQ912 Improves Cognition in Mouse Models of Alzheimer's Disease—Studies on Relation to Effective Target Occupancy ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 362(1): 119-30.
- Holler, Christopher J. et al. 2012. « BACE2 Expression Increases in Human Neurodegenerative Disease ». *The American Journal of Pathology* 180(1): 337-50.
- Holmes, Roger S, Kimberley D Spradling Reeves, et Laura A Cox. 2017. « Mammalian Glutamyl Aminopeptidase Genes (ENPEP) and Proteins: Comparative Studies of a Major Contributor to

- Arterial Hypertension ». *Journal of Data Mining in Genomics & Proteomics* 08(02).
<https://www.omicsonline.org/open-access/mammalian-glutamyl-aminopeptidase-genes-enpep-and-proteinscomparative-studies-of-a-major-contributor-to-arterial-hypertension-2153-0602-1000211.php?aid=90993> (26 août 2020).
- Hong, Liang, Han-Chang Huang, et Zhao-Feng Jiang. 2014. « Relationship between Amyloid-Beta and the Ubiquitin-Proteasome System in Alzheimer's Disease ». *Neurological Research* 36(3): 276-82.
- Hong, Wei et al. 2018. « Diffusible, Highly Bioactive Oligomers Represent a Critical Minority of Soluble A β in Alzheimer's Disease Brain ». *Acta Neuropathologica* 136(1): 19-40.
- Hornung, Karen et al. 2019. « N-Terminal Truncated A β 4-42 Is a Substrate for Nephilysin Degradation in vitro and in vivo ». *Journal of Alzheimer's Disease* 67(3): 849-58.
- Hroudová, Jana, Namrata Singh, et Zdeněk Fišar. 2014. « Mitochondrial Dysfunctions in Neurodegenerative Diseases: Relevance to Alzheimer's Disease ». *BioMed Research International* 2014: 1-9.
- Hsia, Hung-En et al. 2019. « Functions of 'A Disintegrin and Metalloproteases (ADAMs)' in the Mammalian Nervous System ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(16): 3055-81.
- Hu, Xiangyou et al. 2013. « BACE1 Regulates Hippocampal Astrogenesis via the Jagged1-Notch Pathway ». *Cell Reports* 4(1): 40-49.
- Hung, Shih-Ya, et Wen-Mei Fu. 2017. « Drug Candidates in Clinical Trials for Alzheimer's Disease ». *Journal of Biomedical Science* 24(1): 47.
- Hussain, I. et al. 1999. « Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as Beta-Secretase ». *Molecular and Cellular Neurosciences* 14(6): 419-27.
- Iadanza, Matthew G. et al. 2018. « A New Era for Understanding Amyloid Structures and Disease ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19(12): 755-73.
- Ihara, Ryoko. 2016. « [New diagnostic guidelines for Alzheimer's disease by NIA/AA] ». *Nihon Rinsho. Japanese Journal of Clinical Medicine* 74(3): 386-94.
- Iqbal, Khalid, Fei Liu, et Cheng-Xin Gong. 2016. « Tau and Neurodegenerative Disease: The Story so Far ». *Nature Reviews Neurology* 12(1): 15-27.
- Iraji, Aida et al. 2020. « Novel Small Molecule Therapeutic Agents for Alzheimer Disease: Focusing on BACE1 and Multi-Target Directed Ligands ». *Bioorganic Chemistry* 97: 103649.
- Isik, Ahmet Turan, Pinar Soysal, Adnan Yay, et Cansu Usarel. 2017. « The Effects of Sitagliptin, a DPP-4 Inhibitor, on Cognitive Functions in Elderly Diabetic Patients with or without Alzheimer's Disease ». *Diabetes Research and Clinical Practice* 123: 192-98.
- Jadhav, Santosh et al. 2019. « A Walk through Tau Therapeutic Strategies ». *Acta Neuropathologica Communications* 7(1): 22.
- Jawhar, Sadim et al. 2011. « Overexpression of Glutaminyl Cyclase, the Enzyme Responsible for Pyroglutamate A β Formation, Induces Behavioral Deficits, and Glutaminyl Cyclase Knock-out

- Rescues the Behavioral Phenotype in 5XFAD Mice ». *Journal of Biological Chemistry* 286(6): 4454-60.
- Jefferson, Tamara et al. 2011. « Metalloprotease Meprin β Generates Nontoxic N-Terminal Amyloid Precursor Protein Fragments *in Vivo* ». *Journal of Biological Chemistry* 286(31): 27741-50.
- Jekel, Katrin et al. 2015. « Mild Cognitive Impairment and Deficits in Instrumental Activities of Daily Living: A Systematic Review ». *Alzheimer's Research & Therapy* 7(1): 17.
- Jendroska, K. et al. 1995. « Ischemic Stress Induces Deposition of Amyloid ? Immunoreactivity in Human Brain ». *Acta Neuropathologica* 90(5): 461-66.
- Jendroska, K., O. M. Hoffmann, et S. Patt. 1997. « Amyloid ? Peptide and Precursor Protein (APP) in Mild and Severe Brain Ischemia ». *Annals of the New York Academy of Sciences* 826(1 Cerebrovascul): 401-5.
- Jiang, Chunmei et al. 2017. « The Gut Microbiota and Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 58(1): 1-15.
- Jiang, Teng et al. 2014. « Upregulation of TREM2 Ameliorates Neuropathology and Rescues Spatial Cognitive Impairment in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Neuropsychopharmacology* 39(13): 2949-62.
- Jiang, Teng, Jin-Tai Yu, Xi-Chen Zhu, et Lan Tan. 2013a. « TREM2 in Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurobiology* 48(1): 180-85.
- . 2013b. « TREM2 in Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurobiology* 48(1): 180-85.
- Jiang, Ying et al. 2019. « Lysosomal Dysfunction in Down Syndrome Is APP-Dependent and Mediated by APP-BCTF (C99) ». *The Journal of Neuroscience* 39(27): 5255-68.
- Jin, Lw et al. 1994. « Peptides Containing the RERMS Sequence of Amyloid Beta/A4 Protein Precursor Bind Cell Surface and Promote Neurite Extension ». *The Journal of Neuroscience* 14(9): 5461-70.
- Jin, Wang-Sheng et al. 2017. « Plasma Amyloid-Beta Levels in Patients with Different Types of Cancer ». *Neurotoxicity Research* 31(2): 283-88.
- Joaquín Merino, José, Vilma Muñetón-Gómez, María-Isabel Álvarez, et Adolfo Toledano-Díaz. 2016. « Effects of CX3CR1 and Fractalkine Chemokines in Amyloid Beta Clearance and P-Tau Accumulation in Alzheimer's Disease (AD) Rodent Models: Is Fractalkine a Systemic Biomarker for AD? ». *Current Alzheimer Research* 13(4): 403-12.
- Johnson, Gail V.W., et Scott M. Jenkins. 1999. « Tau Protein in Normal and Alzheimer's Disease Brain* ». *Journal of Alzheimer's Disease* 1(4-5): 307-28.
- Jonsson, Thorlakur et al. 2012. « A Mutation in APP Protects against Alzheimer's Disease and Age-Related Cognitive Decline ». *Nature* 488(7409): 96-99.
- Joshi, P et al. 2014. « Microglia Convert Aggregated Amyloid- β into Neurotoxic Forms through the Shedding of Microvesicles ». *Cell Death & Differentiation* 21(4): 582-93.

- Jost, Marco M. et al. 2009. « In Vivo Profiling of DPP4 Inhibitors Reveals Alterations in Collagen Metabolism and Accumulation of an Amyloid Peptide in Rat Plasma ». *Biochemical Pharmacology* 77(2): 228-37.
- Kaneko, Masayuki, Ryo Saito, Yasunobu Okuma, et Yasuyuki Nomura. 2012. « Possible Involvement of Ubiquitin Ligase HRD1 Insolubilization in Amyloid β Generation ». *Biological & Pharmaceutical Bulletin* 35(2): 269-72.
- Kang, Jie et al. 1987. « The Precursor of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Protein Resembles a Cell-Surface Receptor ». *Nature* 325(6106): 733-36.
- Kao, Yu-Chia et al. 2020. « Lipids and Alzheimer's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 21(4): 1505.
- Karkisaval, Abhijith G et al. 2020. « Ion Channel Formation by N-Terminally Truncated A β (4–42): Relevance for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 29: 102235.
- Kaur, G et al. 2017. « Lysosomal Dysfunction in the Brain of a Mouse Model with Intraneuronal Accumulation of Carboxyl Terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein ». *Molecular Psychiatry* 22(7): 981-89.
- Kawasaki, Takeshi et al. 2018. « DPP4 Inhibition by Sitagliptin Attenuates LPS-Induced Lung Injury in Mice ». *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* 315(5): L834-45.
- Kehoe, Patrick Gavin, Elliott Hibbs, Laura E. Palmer, et J. Scott Miners. 2017. « Angiotensin-III is Increased in Alzheimer's Disease in Association with Amyloid- β and Tau Pathology ». *Journal of Alzheimer's Disease* 58(1): 203-14.
- Kelleher, Raymond J., et Jie Shen. 2017. « Presenilin-1 Mutations and Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(4): 629-31.
- Kidd, M. 1963. « Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease ». *Nature* 197(4863): 192-93.
- Kienlen-Campard, Pascal et al. 2008. « Amyloidogenic Processing but Not Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular C-Terminal Domain Production Requires a Precisely Oriented APP Dimer Assembled by Transmembrane G XXX G Motifs ». *Journal of Biological Chemistry* 283(12): 7733-44.
- Kilger, Ellen et al. 2011. « BRI2 Protein Regulates β -Amyloid Degradation by Increasing Levels of Secreted Insulin-Degrading Enzyme (IDE) ». *Journal of Biological Chemistry* 286(43): 37446-57.
- Killin, Lewis O. J., John M. Starr, Ivy J. Shiue, et Tom C. Russ. 2016. « Environmental Risk Factors for Dementia: A Systematic Review ». *BMC Geriatrics* 16(1): 175.
- Kim, Hye-Sun et al. 2003. « C-Terminal Fragments of Amyloid Precursor Protein Exert Neurotoxicity by Inducing Glycogen Synthase Kinase-3 β Expression ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 17(13): 1951-53.

- Kim, Jong Hun. 2018. « Genetics of Alzheimer's Disease ». *Dementia and Neurocognitive Disorders* 17(4): 131.
- Kim, Kyoung Mi et al. 2017. « Identification of Senescent Cell Surface Targetable Protein DPP4 ». *Genes & Development* 31(15): 1529-34.
- King, Anthony. 2018. « The Search for Better Animal Models of Alzheimer's Disease ». *Nature* 559(7715): S13-15.
- Kirabali, Tunahan et al. 2019. « The Amyloid- β Degradation Intermediate A β 34 Is Pericyte-Associated and Reduced in Brain Capillaries of Patients with Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica Communications* 7(1): 194.
- Kitazawa, Masashi, Heng-Wei Hsu, et Rodrigo Medeiros. 2016. « Copper Exposure Perturbs Brain Inflammatory Responses and Impairs Clearance of Amyloid-Beta ». *Toxicological Sciences* 152(1): 194-204.
- Klatt, Stephan et al. 2013. « Production of Glycosylated Soluble Amyloid Precursor Protein Alpha (SAPPalpha) in *Leishmania Tarentolae* ». *Journal of Proteome Research* 12(1): 396-403.
- Knight, E. M. et al. 2013. « Age-Related Changes in Core Body Temperature and Activity in Triple-Transgenic Alzheimer's Disease (3xTgAD) Mice ». *Disease Models & Mechanisms* 6(1): 160-70.
- Koelsch, Gerald. 2017. « BACE1 Function and Inhibition: Implications of Intervention in the Amyloid Pathway of Alzheimer's Disease Pathology ». *Molecules (Basel, Switzerland)* 22(10).
- Koike, Maya A. et al. 2012. « APP Knockout Mice Experience Acute Mortality as the Result of Ischemia » éd. Simone Di Giovanni. *PLoS ONE* 7(8): e42665.
- Konietzko, Uwe. 2012. « AICD Nuclear Signaling and Its Possible Contribution to Alzheimers Disease ». *Current Alzheimer Research* 9(2): 200-216.
- Kopan, Raphael, et Ma. Xenia G. Ilagan. 2004. « γ -Secretase: Proteasome of the Membrane? » *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 5(6): 499-504.
- Kosaraju, Jayasankar et al. 2013. « Vildagliptin: An Anti-Diabetes Agent Ameliorates Cognitive Deficits and Pathology Observed in Streptozotocin-Induced Alzheimer's Disease: Vildagliptin Ameliorates Alzheimer's ». *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 65(12): 1773-84.
- . 2014. « Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibition by Pterocarpus Marsupium and Eugenia Jambolana Ameliorates Streptozotocin Induced Alzheimer's Disease ». *Behavioural Brain Research* 267: 55-65.
- Kosaraju, Jayasankar, R. M. Damian Holsinger, Lixia Guo, et Kin Yip Tam. 2017. « Linagliptin, a Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Mitigates Cognitive Deficits and Pathology in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurobiology* 54(8): 6074-84.
- Krakauer, M., P. S. Sorensen, et F. Sellebjerg. 2006. « CD4(+) Memory T Cells with High CD26 Surface Expression Are Enriched for Th1 Markers and Correlate with Clinical Severity of Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 181(1-2): 157-64.

- Kshirsagar, Viplav, Chetan Thingore, et Archana Juvekar. 2020. « Insulin Resistance: A Connecting Link between Alzheimer's Disease and Metabolic Disorder ». *Metabolic Brain Disease*. <http://link.springer.com/10.1007/s11011-020-00622-2> (12 octobre 2020).
- Kuang, Huang et al. 2020. « Exploring the Bi-directional Relationship between Autophagy and Alzheimer's Disease ». *CNS Neuroscience & Therapeutics* 26(2): 155-66.
- Kucheryavykh, Lilia Y. et al. 2019. « Accumulation of Innate Amyloid Beta Peptide in Glioblastoma Tumors ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(10): 2482.
- Kuhn, Peer-Hendrik et al. 2010. « ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive α -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons ». *The EMBO Journal* 29(17): 3020-32.
- . 2012. « Secretome Protein Enrichment Identifies Physiological BACE1 Protease Substrates in Neurons: Proteomic Identification of BACE1 Substrates ». *The EMBO Journal* 31(14): 3157-68.
- Kumar, Deepak Kumar Vijaya et al. 2016. « Amyloid- β Peptide Protects against Microbial Infection in Mouse and Worm Models of Alzheimer's Disease ». *Science Translational Medicine* 8(340): 340ra72-340ra72.
- Kwart, Dylan et al. 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 ». *Neuron* 104(2): 256-270.e5.
- La Joie, Renaud et al. 2020. « Prospective Longitudinal Atrophy in Alzheimer's Disease Correlates with the Intensity and Topography of Baseline Tau-PET ». *Science Translational Medicine* 12(524): eaau5732.
- Lachno, D. Richard et al. 2015. « Validation and Clinical Utility of ELISA Methods for Quantification of Amyloid- β Peptides in Cerebrospinal Fluid Specimens from Alzheimer's Disease Studies ». *Journal of Alzheimer's Disease* 45(2): 527-42.
- Lambeir, Anne-Marie, Christine Durinx, Simon Scharpé, et Ingrid De Meester. 2003. « Dipeptidyl-Peptidase IV from Bench to Bedside: An Update on Structural Properties, Functions, and Clinical Aspects of the Enzyme DPP IV ». *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences* 40(3): 209-94.
- Lambert, M. P. et al. 1998. « Diffusible, Nonfibrillar Ligands Derived from A 1-42 Are Potent Central Nervous System Neurotoxins ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95(11): 6448-53.
- Lamers, Daniela et al. 2011. « Dipeptidyl Peptidase 4 Is a Novel Adipokine Potentially Linking Obesity to the Metabolic Syndrome ». *Diabetes* 60(7): 1917-25.
- Lane, C. A., J. Hardy, et J. M. Schott. 2018. « Alzheimer's Disease ». *European Journal of Neurology* 25(1): 59-70.
- Larsson, Susanna, et Nicola Orsini. 2018. « Coffee Consumption and Risk of Dementia and Alzheimer's Disease: A Dose-Response Meta-Analysis of Prospective Studies ». *Nutrients* 10(10): 1501.

- Lashley, Tammaryn et al. 2015. « Alterations in Global DNA Methylation and Hydroxymethylation Are Not Detected in Alzheimer's Disease: Global DNA Methylation in AD ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 41(4): 497-506.
- Laulagnier, Karine et al. 2018. « Amyloid Precursor Protein Products Concentrate in a Subset of Exosomes Specifically Endocytosed by Neurons ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 75(4): 757-73.
- Lauritzen, I. et al. 2012. « The γ -Secretase-Derived C-Terminal Fragment of APP, C99, But Not A_β, Is a Key Contributor to Early Intraneuronal Lesions in Triple-Transgenic Mouse Hippocampus ». *Journal of Neuroscience* 32(46): 16243-55.
- . 2019. « Does Intraneuronal Accumulation of Carboxyl-Terminal Fragments of the Amyloid Precursor Protein Trigger Early Neurotoxicity in Alzheimer's Disease? ». *Current Alzheimer Research* 16(5): 453-57.
- Lauritzen, Inger et al. 2016. « Intraneuronal Aggregation of the β -CTF Fragment of APP (C99) Induces $A\beta$ -Independent Lysosomal-Autophagic Pathology ». *Acta Neuropathologica* 132(2): 257-76.
- . 2019. « Targeting γ -Secretase Triggers the Selective Enrichment of Oligomeric APP-CTFs in Brain Extracellular Vesicles from Alzheimer Cell and Mouse Models ». *Translational Neurodegeneration* 8: 35.
- Lavergne-slove, Anne. « Universalis-Encyclopedie-Amylose ». *Universalis.fr*.
<https://www.universalis.fr/encyclopedie/amylose/>.
- Lazarevic, Vesna et al. 2017. « Physiological Concentrations of Amyloid Beta Regulate Recycling of Synaptic Vesicles via Alpha7 Acetylcholine Receptor and CDK5/Calcineurin Signaling ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 221.
- Lee, Edward B. et al. 2003. « Secretion and Intracellular Generation of Truncated $A\beta$ in β -Site Amyloid- β Precursor Protein-Cleaving Enzyme Expressing Human Neurons ». *Journal of Biological Chemistry* 278(7): 4458-66.
- Lee, G. 2004. « Phosphorylation of Tau by Fyn: Implications for Alzheimer's Disease ». *Journal of Neuroscience* 24(9): 2304-12.
- Lee, Joon et al. 2014. « Role of the Fast Kinetics of Pyroglutamate-Modified Amyloid- β Oligomers in Membrane Binding and Membrane Permeability ». *Biochemistry* 53(28): 4704-14.
- Lei, Xiaofeng et al. 2015. « Downregulated MiR-29c Correlates with Increased BACE1 Expression in Sporadic Alzheimer's Disease ». *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 8(2): 1565-74.
- Leissring, Malcolm A et al. 2003. « Enhanced Proteolysis of β -Amyloid in APP Transgenic Mice Prevents Plaque Formation, Secondary Pathology, and Premature Death ». *Neuron* 40(6): 1087-93.
- Lesné, Sylvain E. 2013. « Breaking the Code of Amyloid- β Oligomers ». *International Journal of Cell Biology* 2013: 1-6.
- Levy-Lahad, E. et al. 1995. « Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus ». *Science* 269(5226): 973-77.

- Li, Tong et al. 2016. « The Neuritic Plaque Facilitates Pathological Conversion of Tau in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *Nature Communications* 7(1): 12082.
- Li, Yi et al. 2014. « Structural Biology of Presenilin 1 Complexes ». *Molecular Neurodegeneration* 9: 59.
- Liebsch, Filip et al. 2019. « A β 34 Is a BACE1-Derived Degradation Intermediate Associated with Amyloid Clearance and Alzheimer's Disease Progression ». *Nature Communications* 10(1): 2240.
- Liu, Kangning et al. 2006. « Characterization of A β 11-40/42 Peptide Deposition in Alzheimer's Disease and Young Down's Syndrome Brains: Implication of N-Terminally Truncated A β Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 112(2): 163-74.
- Liu, R.-M. et al. 2011. « Knockout of Plasminogen Activator Inhibitor 1 Gene Reduces Amyloid Beta Peptide Burden in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 32(6): 1079-89.
- Liu, Yan, Michel Nguyen, Anne Robert, et Bernard Meunier. 2019. « Metal Ions in Alzheimer's Disease: A Key Role or Not? ». *Accounts of Chemical Research* 52(7): 2026-35.
- Llorens-Cortes, Catherine, et Rhian M. Touyz. 2020. « Evolution of a New Class of Antihypertensive Drugs: Targeting the Brain Renin-Angiotensin System ». *Hypertension* 75(1): 6-15.
- Lonskaya, Irina et al. 2014. « Nilotinib-Induced Autophagic Changes Increase Endogenous Parkin Level and Ubiquitination, Leading to Amyloid Clearance ». *Journal of Molecular Medicine* 92(4): 373-86.
- Lopez Sanchez, M Isabel G, Peter Wijngaarden, et Ian A Trounce. 2019. « Amyloid Precursor Protein-mediated Mitochondrial Regulation and Alzheimer's Disease ». *British Journal of Pharmacology* 176(18): 3464-74.
- Lopez-Noguerola, Jose S. et al. 2018. « Synergistic Effect on Neurodegeneration by N-Truncated A β 4-42 and Pyroglutamate A β 3-42 in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 10. <http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnagi.2018.00064/full> (12 novembre 2018).
- Lorenzl, Stefan, Katharina Burger, Harald Hampel, et M. Flint Beal. 2008. « Profiles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Plasma of Patients with Dementia ». *International Psychogeriatrics* 20(1): 67-76.
- Lu, Daniel C. et al. 2000. « A Second Cytotoxic Proteolytic Peptide Derived from Amyloid β -Protein Precursor ». *Nature Medicine* 6(4): 397-404.
- Lunnon, Katie et al. 2014. « Methyloomic Profiling Implicates Cortical Deregulation of ANK1 in Alzheimer's Disease ». *Nature Neuroscience* 17(9): 1164-70.
- Madani, Rime et al. 2006. « Lack of Neprilysin Suffices to Generate Murine Amyloid-like Deposits in the Brain and Behavioral Deficit in Vivo ». *Journal of Neuroscience Research* 84(8): 1871-78.
- Maddalena, Alessia S. et al. 2004. « Cerebrospinal Fluid Profile of Amyloid β Peptides in Patients with Alzheimer's Disease Determined by Protein Biochip Technology ». *Neurodegenerative Diseases* 1(4-5): 231-35.

- Maezawa, Izumi, Pavel I. Zimin, Heike Wulff, et Lee-Way Jin. 2011. « Amyloid- β Protein Oligomer at Low Nanomolar Concentrations Activates Microglia and Induces Microglial Neurotoxicity ». *Journal of Biological Chemistry* 286(5): 3693-3706.
- Magnin, E. et al. 2017. « Les biomarqueurs du liquide cérébro-spinal dans la maladie d'Alzheimer : un outil de recherche utile dans la pratique clinique courante des consultations mémoire pour les cas complexes ». *La Revue de Médecine Interne* 38(4): 250-55.
- Maia, Miguel, et Emília Sousa. 2019. « BACE-1 and γ -Secretase as Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease ». *Pharmaceuticals* 12(1): 41.
- Maler, Juan Manuel et al. 2007. « Urea-Based Two-Dimensional Electrophoresis of Beta-Amyloid Peptides in Human Plasma: Evidence for Novel A β Species ». *PROTEOMICS* 7(20): 3815-20.
- Mandler, Markus et al. 2014. « Pyroglutamylated Amyloid- β Is Associated with Hyperphosphorylated Tau and Severity of Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 128(1): 67-79.
- Marc, Yannick et al. 2012. « Central Antihypertensive Effects of Orally Active Aminopeptidase A Inhibitors in Spontaneously Hypertensive Rats ». *Hypertension* 60(2): 411-18.
- Mares, V. 2012. « Compartment- and malignance-dependent up-regulation of γ -glutamyltranspeptidase and dipetidylpeptidase-IV activity in human brain gliomas ». *Histology and Histopathology* (27): 931-40.
- Marguet, D. et al. 2000. « Enhanced Insulin Secretion and Improved Glucose Tolerance in Mice Lacking CD26 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97(12): 6874-79.
- Marr, Robert A. et al. 2003. « Nprilysin Gene Transfer Reduces Human Amyloid Pathology in Transgenic Mice ». *The Journal of Neuroscience* 23(6): 1992-96.
- Marwarha, Gurdeep et al. 2019. « A Diet Enriched in Palmitate and Deficient in Linoleate Exacerbates Oxidative Stress and Amyloid- β Burden in the Hippocampus of 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer's Disease » éd. Matthew Pase. *Journal of Alzheimer's Disease* 68(1): 219-37.
- Mastrangelo, Michael A, et William J Bowers. 2008. « Detailed Immunohistochemical Characterization of Temporal and Spatial Progression of Alzheimer's Disease-Related Pathologies in Male Triple-Transgenic Mice ». *BMC Neuroscience* 9(1): 81.
- Matsumura, Satoko et al. 2011. « Two Distinct Amyloid β -Protein (A β) Assembly Pathways Leading to Oligomers and Fibrils Identified by Combined Fluorescence Correlation Spectroscopy, Morphology, and Toxicity Analyses ». *Journal of Biological Chemistry* 286(13): 11555-62.
- Matteucci, E., et O. Giampietro. 2009. « Dipeptidyl Peptidase-4 (CD26): Knowing the Function before Inhibiting the Enzyme ». *Current Medicinal Chemistry* 16(23): 2943-51.
- Mattson, M. P. et al. 1992. « Beta-Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 12(2): 376-89.
- Mattsson, Niklas et al. 2012. « BACE1 Inhibition Induces a Specific Cerebrospinal Fluid β -Amyloid Pattern That Identifies Drug Effects in the Central Nervous System » éd. Stephen D. Ginsberg. *PLoS ONE* 7(2): e31084.

- Mazzitelli, Sonia et al. 2016. « Amyloid- β 1–24 C-Terminal Truncated Fragment Promotes Amyloid- β 1–42 Aggregate Formation in the Healthy Brain ». *Acta Neuropathologica Communications* 4(1). <http://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-016-0381-9> (12 novembre 2018).
- McKhann, G. et al. 1984. « Clinical Diagnosis of Alzheimer's Disease: Report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the Auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease ». *Neurology* 34(7): 939-44.
- McKinnon, Chris, et Sarah J. Tabrizi. 2014. « The Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegeneration ». *Antioxidants & Redox Signaling* 21(17): 2302-21.
- Meckler, Xavier, et Frédéric Checler. 2016. « Presenilin 1 and Presenilin 2 Target γ -Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments ». *Journal of Biological Chemistry* 291(24): 12821-37.
- Meilandt, W. J. et al. 2009. « Nephilysin Overexpression Inhibits Plaque Formation But Fails to Reduce Pathogenic A Oligomers and Associated Cognitive Deficits in Human Amyloid Precursor Protein Transgenic Mice ». *Journal of Neuroscience* 29(7): 1977-86.
- Meißner, Julius N., Yvonne Bouter, et Thomas A. Bayer. 2015. « Neuron Loss and Behavioral Deficits in the TBA42 Mouse Model Expressing N-Truncated Pyroglutamate Amyloid- β 3–42 ». *Journal of Alzheimer's Disease* 45(2): 471-82.
- Menon, Preeti Kumaran, Niina Anneli Koistinen, Kerstin Iverfeldt, et Anna-Lena Ström. 2019. « Phosphorylation of the Amyloid Precursor Protein (APP) at Ser-675 Promotes APP Processing Involving Meprin β ». *Journal of Biological Chemistry* 294(47): 17768-76.
- Meral, Derya, et Brigita Urbanc. 2013. « Discrete Molecular Dynamics Study of Oligomer Formation by N-Terminally Truncated Amyloid β -Protein ». *Journal of Molecular Biology* 425(12): 2260-75.
- Mi, Zhiping et al. 2016. « Tenascin-C Is Associated with Cored Amyloid- β Plaques in Alzheimer Disease and Pathology Burdened Cognitively Normal Elderly ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 75(9): 868-76.
- Milosch, N et al. 2014. « Holo-APP and G-Protein-Mediated Signaling Are Required for SAPP α -Induced Activation of the Akt Survival Pathway ». *Cell Death & Disease* 5(8): e1391-e1391.
- Miravalle, Leticia et al. 2005. « Amino-Terminally Truncated A β Peptide Species Are the Main Component of Cotton Wool Plaques[†] ». *Biochemistry* 44(32): 10810-21.
- Mizutani, Shigehiko et al. 2008. « New Insights into the Importance of Aminopeptidase A in Hypertension ». *Heart Failure Reviews* 13(3): 273-84.
- Möller, H.-J., et M. B. Graeber. 1998. « The case described by Alois Alzheimer in 1911 ». *European Archives of Psychiatry and Clinical Neuroscience* 248(3): 111-22.
- Montagne, Axel et al. 2015. « Blood-Brain Barrier Breakdown in the Aging Human Hippocampus ». *Neuron* 85(2): 296-302.
- Moore, Brenda D. et al. 2018. « Short A β Peptides Attenuate A β 42 Toxicity in Vivo ». *The Journal of Experimental Medicine* 215(1): 283-301.

- Morawski, Markus et al. 2010. « Distinct Glutaminyi Cyclase Expression in Edinger–Westphal Nucleus, Locus Coeruleus and Nucleus Basalis Meynert Contributes to pGlu-A β Pathology in Alzheimer’s Disease ». *Acta Neuropathologica* 120(2): 195-207.
- . 2014. « Glutaminyi Cyclase in Human Cortex: Correlation with (pGlu)-Amyloid- β Load and Cognitive Decline in Alzheimer’s Disease ». *Journal of Alzheimer’s Disease* 39(2): 385-400.
- Mori, H., K. Takio, M. Ogawara, et D. J. Selkoe. 1992. « Mass Spectrometry of Purified Amyloid Beta Protein in Alzheimer’s Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 267(24): 17082-86.
- Morris, J. C. et al. 2014. « Harmonized Diagnostic Criteria for Alzheimer’s Disease: Recommendations ». *Journal of Internal Medicine* 275(3): 204-13.
- de Mota, Nadia et al. 2008. « Human Brain Aminopeptidase A: Biochemical Properties and Distribution in Brain Nuclei ». *Journal of Neurochemistry* 106(1): 416-28.
- Moulton, Paula Valencia, et Wei Yang. 2012. « Air Pollution, Oxidative Stress, and Alzheimer’s Disease ». *Journal of Environmental and Public Health* 2012: 1-9.
- Moussa-Pacha, Nour M. et al. 2020. « BACE1 Inhibitors: Current Status and Future Directions in Treating Alzheimer’s Disease ». *Medicinal Research Reviews* 40(1): 339-84.
- Mouw, Janna K., Guanqing Ou, et Valerie M. Weaver. 2014. « Extracellular Matrix Assembly: A Multiscale Deconstruction ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 15(12): 771-85.
- Moyse, Emmanuel et al. 2019. « Common Pathological Mechanisms and Risk Factors for Alzheimer’s Disease and Type-2 Diabetes: Focus on Inflammation ». *Current Alzheimer Research* 16(11): 986-1006.
- Mputhia, Zoe et al. 2019. « Autophagy Modulation as a Treatment of Amyloid Diseases ». *Molecules* 24(18): 3372.
- Mueller-Steiner, Sarah et al. 2006. « Anti-amyloidogenic and Neuroprotective Functions of Cathepsin B: Implications for Alzheimer’s Disease ». *Neuron* 51(6): 703-14.
- Müller, Ulrike C., Thomas Deller, et Martin Korte. 2017. « Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family ». *Nature Reviews Neuroscience* 18(5): 281-98.
- Mura, Elisa et al. 2012. « Dual Effect of Beta-Amyloid on A7 and A4 β 2 Nicotinic Receptors Controlling the Release of Glutamate, Aspartate and GABA in Rat Hippocampus » éd. Maria A. Deli. *PLoS ONE* 7(1): e29661.
- Nabeno, Mika et al. 2013. « A Comparative Study of the Binding Modes of Recently Launched Dipeptidyl Peptidase IV Inhibitors in the Active Site ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 434(2): 191-96.
- Nagata, Tomoyuki et al. 2015. « Association between DNA Methylation of the BDNF Promoter Region and Clinical Presentation in Alzheimer’s Disease ». *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders Extra* 5(1): 64-73.
- Nakamura, Takuto, Masanobu Yamazato, Akio Ishida, et Yusuke Ohya. 2017. « Excess of Aminopeptidase A in the Brain Elevates Blood Pressure via the Angiotensin II Type 1 and

- Bradykinin B2 Receptors without Dipsogenic Effect ». *International Journal of Hypertension* 2017: 1-8.
- Nakaya, Tadashi, et Toshiharu Suzuki. 2006. « Role of APP Phosphorylation in FE65-Dependent Gene Transactivation Mediated by AICD ». *Genes to Cells* 11(6): 633-45.
- Nanus, D. M. et al. 1993. « Molecular Cloning of the Human Kidney Differentiation Antigen Gp160: Human Aminopeptidase A. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90(15): 7069-73.
- Narayan, Pritika J. et al. 2015. « Increased Acetyl and Total Histone Levels in Post-Mortem Alzheimer's Disease Brain ». *Neurobiology of Disease* 74: 281-94.
- Nargis, Titli, et Partha Chakrabarti. 2018. « Significance of Circulatory DPP4 Activity in Metabolic Diseases: CIRCULATORY DPP4 AND METABOLIC DISEASES ». *IUBMB Life* 70(2): 112-19.
- Naslund, J. et al. 1994. « Relative Abundance of Alzheimer A Beta Amyloid Peptide Variants in Alzheimer Disease and Normal Aging. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91(18): 8378-82.
- Nativio, Raffaella et al. 2018. « Dysregulation of the Epigenetic Landscape of Normal Aging in Alzheimer's Disease ». *Nature Neuroscience* 21(4): 497-505.
- Neddens, Joerg et al. 2018. « Phosphorylation of Different Tau Sites during Progression of Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica Communications* 6(1): 52.
- Newcombe, Estella A. et al. 2018. « Inflammation: The Link between Comorbidities, Genetics, and Alzheimer's Disease ». *Journal of Neuroinflammation* 15(1): 276.
- Nhan, Hoang S., Karen Chiang, et Edward H. Koo. 2015. « The Multifaceted Nature of Amyloid Precursor Protein and Its Proteolytic Fragments: Friends and Foes ». *Acta Neuropathologica* 129(1): 1-19.
- Nie, Pengju, Abhishek Vartak, et Yue-Ming Li. 2020. « γ -Secretase Inhibitors and Modulators: Mechanistic Insights into the Function and Regulation of γ -Secretase ». *Seminars in Cell & Developmental Biology*: S1084952118302763.
- Ninomiya, Toshiharu et al. 2011. « Midlife and Late-Life Blood Pressure and Dementia in Japanese Elderly: The Hisayama Study ». *Hypertension* 58(1): 22-28.
- Nishitsuji, Kazuchika et al. 2009. « The E693 Δ Mutation in Amyloid Precursor Protein Increases Intracellular Accumulation of Amyloid β Oligomers and Causes Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Cultured Cells ». *The American Journal of Pathology* 174(3): 957-69.
- Nistala, Ravi, et Virginia Savin. 2017. « Diabetes, Hypertension, and Chronic Kidney Disease Progression: Role of DPP4 ». *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 312(4): F661-70.
- Nixon, Ralph A. 2017. « Amyloid Precursor Protein and Endosomal-lysosomal Dysfunction in Alzheimer's Disease: Inseparable Partners in a Multifactorial Disease ». *The FASEB Journal* 31(7): 2729-43.

- Nussbaum, Justin M. et al. 2012. « Prion-like Behaviour and Tau-Dependent Cytotoxicity of Pyroglutamylated Amyloid- β ». *Nature* 485(7400): 651-55.
- Oberstein, Timo Jan et al. 2015. « Astrocytes and Microglia but Not Neurons Preferentially Generate N-Terminally Truncated A β Peptides ». *Neurobiology of Disease* 73: 24-35.
- Obregon, Demian et al. 2012. « Soluble Amyloid Precursor Protein- α Modulates β -Secretase Activity and Amyloid- β Generation ». *Nature Communications* 3(1): 777.
- Oddo, Salvatore et al. 2003. « Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction ». *Neuron* 39(3): 409-21.
- Ogata, S., Y. Misumi, et Y. Ikehara. 1989. « Primary Structure of Rat Liver Dipeptidyl Peptidase IV Deduced from Its CDNA and Identification of the NH₂-Terminal Signal Sequence as the Membrane-Anchoring Domain ». *The Journal of Biological Chemistry* 264(6): 3596-3601.
- Ohnishi, Takayuki et al. 2015. « Na, K-ATPase A3 Is a Death Target of Alzheimer Patient Amyloid- β Assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(32): E4465-74.
- Ohnuma, Kei. 2008. « Role of CD26/Dipeptidyl Peptidase IV in Human T Cell Activation and Function ». *Frontiers in Bioscience* 13(13): 2299.
- Ohnuma, Kei, Nam H. Dang, et Chikao Morimoto. 2008. « Revisiting an Old Acquaintance: CD26 and Its Molecular Mechanisms in T Cell Function ». *Trends in Immunology* 29(6): 295-301.
- Okada, Yasunori. 2017. « Proteinases and Matrix Degradation ». In *Kelley and Firestein's Textbook of Rheumatology*, Elsevier, 106-25.
<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780323316965000085> (11 mai 2020).
- « OMS-organisation mondiale de la santé ». <https://www.who.int/fr/news-room/fact-sheets/detail/dementia>.
- Osborn, Lana M., Willem Kamphuis, Wytse J. Wadman, et Elly M. Hol. 2016. « Astrogliosis: An Integral Player in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Progress in Neurobiology* 144: 121-41.
- Ossenkoppele, Rik et al. 2018. « Discriminative Accuracy of [¹⁸F]Flortaucipir Positron Emission Tomography for Alzheimer Disease vs Other Neurodegenerative Disorders ». *JAMA* 320(11): 1151.
- . 2020. « Assessment of Demographic, Genetic, and Imaging Variables Associated With Brain Resilience and Cognitive Resilience to Pathological Tau in Patients With Alzheimer Disease ». *JAMA Neurology*. <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/2761854> (30 mars 2020).
- Ould-yahoui, Adlane et al. 2009. « A New Role for TIMP-1 in Modulating Neurite Outgrowth and Morphology of Cortical Neurons » éd. Alain Chédotal. *PLoS ONE* 4(12): e8289.
- Paik, Seung R et al. 1998. « Self-Oligomerization of NACP, the Precursor Protein of the Non-Amyloid β /A4 Protein (A β) Component of Alzheimer's Disease Amyloid, Observed in the Presence of a C-Terminal A β Fragment (Residues 25–35) ». *FEBS Letters* 421(1): 73-76.

- Panchal, Maï et al. 2014. « Ceramides and Sphingomyelinases in Senile Plaques ». *Neurobiology of Disease* 65: 193-201.
- Pandey, Poomy et al. 2016. « Amyloid Precursor Protein and Amyloid Precursor-like Protein 2 in Cancer ». *Oncotarget* 7(15). <http://www.oncotarget.com/fulltext/7103> (27 avril 2020).
- Pantelopulos, George A., John E. Straub, D. Thirumalai, et Yuji Sugita. 2018. « Structure of APP-C991–99 and Implications for Role of Extra-Membrane Domains in Function and Oligomerization ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1860(9): 1698-1708.
- Panza, Francesco et al. 2016. « Tau-Centric Targets and Drugs in Clinical Development for the Treatment of Alzheimer’s Disease ». *BioMed Research International* 2016: 3245935.
- Paouri, Evi et al. 2017. « Peripheral Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF- α) Modulates Amyloid Pathology by Regulating Blood-Derived Immune Cells and Glial Response in the Brain of AD/TNF Transgenic Mice ». *The Journal of Neuroscience* 37(20): 5155-71.
- Pardossi-Piquard, R. et al. 2006a. « Neprilysin Activity and Expression Are Controlled by Nicastrin ». *Journal of Neurochemistry* 97(4): 1052-56.
- . 2006b. « Neprilysin Activity and Expression Are Controlled by Nicastrin ». *Journal of Neurochemistry* 97(4): 1052-56.
- Pardossi-Piquard, Raphaëlle et al. 2007. « Response to Correspondence: Pardossi-Piquard et al., “Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the A β -Degrading Enzyme Neprilysin by Intracellular Domains of BetAAPP and APLP.” *Neuron* 46, 541-554 ». *Neuron* 53(4): 483-86.
- Paris, D. et al. 2010. « Impaired Orthotopic Glioma Growth and Vascularization in Transgenic Mouse Models of Alzheimer’s Disease ». *Journal of Neuroscience* 30(34): 11251-58.
- Paris, Daniel et al. 2004. « Inhibition of Angiogenesis by A Peptides ». *Angiogenesis* 7(1): 75-85.
- . 2005. « Inhibition of Angiogenesis and Tumor Growth by β and γ -Secretase Inhibitors ». *European Journal of Pharmacology* 514(1): 1-15.
- Park, Mi Hee et al. 2012. « Mutant Presenilin 2 Increases β -Secretase Activity Through Reactive Oxygen Species–Dependent Activation of Extracellular Signal–Regulated Kinase »: *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 71(2): 130-39.
- Park, S. K. et al. 2009. « Kalopanaxsaponin A Inhibits PMA-Induced Invasion by Reducing Matrix Metalloproteinase-9 via PI3K/Akt- and PKC -Mediated Signaling in MCF-7 Human Breast Cancer Cells ». *Carcinogenesis* 30(7): 1225-33.
- Pasciuto, Emanuela et al. 2015. « Dysregulated ADAM10-Mediated Processing of APP during a Critical Time Window Leads to Synaptic Deficits in Fragile X Syndrome ». *Neuron* 87(2): 382-98.
- Passer, Brent et al. 2000. « Generation of an Apoptotic Intracellular Peptide by γ -Secretase Cleavage of Alzheimer’s Amyloid β Protein Precursor ». *Journal of Alzheimer’s Disease* 2(3-4): 289-301.
- Paumier, Jean-Michel et al. 2019. « Proamyloidogenic Effects of Membrane Type 1 Matrix Metalloproteinase Involve MMP-2 and BACE-1 Activities, and the Modulation of APP Trafficking ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33(2): 2910-27.

- Pavliukeviciene, Bozena et al. 2019. « Amyloid β Oligomers Inhibit Growth of Human Cancer Cells » éd. Aamir Ahmad. *PLOS ONE* 14(9): e0221563.
- Penke, Botond, Mária Szűcs, et Ferenc Bogár. 2020. « Oligomerization and Conformational Change Turn Monomeric β -Amyloid and Tau Proteins Toxic: Their Role in Alzheimer's Pathogenesis ». *Molecules* 25(7): 1659.
- Pera, Marta et al. 2017. « Increased Localization of APP -C99 in Mitochondria-associated ER Membranes Causes Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer Disease ». *The EMBO Journal* 36(22): 3356-71.
- Peress, Nancy, E D Perillo, et Stanley Zucker. 1995. « Localization of Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases in Alzheimer's Disease and Normal Brain ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 54(1): 16-22.
- Perez, Ruth G. et al. 1999. « Mutagenesis Identifies New Signals for β -Amyloid Precursor Protein Endocytosis, Turnover, and the Generation of Secreted Fragments, Including A β 42 ». *Journal of Biological Chemistry* 274(27): 18851-56.
- Pérez-González, Rocío et al. 2019. « A Pleiotropic Role for Exosomes Loaded with the Amyloid β Precursor Protein Carboxyl-Terminal Fragments in the Brain of Down Syndrome Patients ». *Neurobiology of Aging* 84: 26-32.
- Perez-Gonzalez, Rocio, Sebastien A. Gauthier, Asok Kumar, et Efrat Levy. 2012. « The Exosome Secretory Pathway Transports Amyloid Precursor Protein Carboxyl-Terminal Fragments from the Cell into the Brain Extracellular Space ». *The Journal of Biological Chemistry* 287(51): 43108-15.
- Perez-Nievas, Beatriz G. 2019. *The role of glia in alzheimer's disease*. Frontiers in Aging Neuroscience, Neuroscience or Neurology.
<https://books.google.fr/books?id=HsuNDwAAQBAJ&printsec=frontcover&dq=microglia+alzheimer&hl=fr&sa=X&ved=0ahUKEwiAJP7R5PvoAhWlx4UKHcz5DZQQ6AEIOjAC#v=onepage&q&f=false>.
- Pflanzner, Thorsten et al. 2011. « LRP1 Mediates Bidirectional Transcytosis of Amyloid- β across the Blood-Brain Barrier ». *Neurobiology of Aging* 32(12): 2323.e1-2323.e11.
- Pimenova, Anna A., Towfique Raj, et Alison M. Goate. 2018. « Untangling Genetic Risk for Alzheimer's Disease ». *Biological Psychiatry* 83(4): 300-310.
- Plagman, Alexandra et al. 2019. « Cholecystokinin and Alzheimer's Disease: A Biomarker of Metabolic Function, Neural Integrity, and Cognitive Performance ». *Neurobiology of Aging* 76: 201-7.
- Pluta, Ryszard et al. 2013. « Brain Ischemia Activates β - and γ -Secretase Cleavage of Amyloid Precursor Protein: Significance in Sporadic Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurobiology* 47(1): 425-34.
- Pluta, Ryszard, Marzena Ułamek-Kozioł, Sławomir Januszewski, et Stanisław Czuczwar. 2019. « Amyloid pathology in the brain after ischemia ». *Folia Neuropathologica* 57(3): 220-26.
- Pontecorvo, Michael J et al. 2019. « A Multicentre Longitudinal Study of Flortaucipir (18F) in Normal Ageing, Mild Cognitive Impairment and Alzheimer's Disease Dementia ». *Brain* 142(6): 1723-35.

- Popugaeva, Elena, Ekaterina Pchitskaya, et Ilya Bezprozvanny. 2018. « Dysregulation of Intracellular Calcium Signaling in Alzheimer's Disease ». *Antioxidants & Redox Signaling* 29(12): 1176-88.
- Portbury, Stuart, et Paul Adlard. 2017. « Zinc Signal in Brain Diseases ». *International Journal of Molecular Sciences* 18(12): 2506.
- Portelius, Erik et al. 2010. « Identification of Novel N-Terminal Fragments of Amyloid Precursor Protein in Cerebrospinal Fluid ». *Experimental Neurology* 223(2): 351-58.
- . 2014. « β -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1(BACE1) Inhibitor Treatment Induces A β 5-X Peptides through Alternative Amyloid Precursor Protein Cleavage ». *Alzheimer's Research & Therapy* 6(5-8): 75.
- Pousinha, Paula A. et al. 2019. « The Amyloid Precursor Protein C-Terminal Domain Alters CA1 Neuron Firing, Modifying Hippocampus Oscillations and Impairing Spatial Memory Encoding ». *Cell Reports* 29(2): 317-331.e5.
- Prasad, Hari, et Rajini Rao. 2018. « Amyloid Clearance Defect in ApoE4 Astrocytes Is Reversed by Epigenetic Correction of Endosomal PH ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115(28): E6640-49.
- Press-Sandler, Olga, et Yifat Miller. 2020. « Assessments of the Effect of Neurokinin B on Toxic A β Aggregates in Alzheimer's Disease with the Molecular Mechanisms Action ». *ACS Chemical Neuroscience*: acschemneuro.0c00535.
- Prinz, Marco, et Josef Priller. 2017. « The Role of Peripheral Immune Cells in the CNS in Steady State and Disease ». *Nature Neuroscience* 20(2): 136-44.
- Provost, Patrick. 2010. « Interpretation and Applicability of MicroRNA Data to the Context of Alzheimer's and Age-Related Diseases ». *Aging* 2(3): 166-69.
- Puertas, María del Carmen et al. 2013. « Plasma Renin–Angiotensin System-Regulating Aminopeptidase Activities Are Modified in Early Stage Alzheimer's Disease and Show Gender Differences but Are Not Related to Apolipoprotein E Genotype ». *Experimental Gerontology* 48(6): 557-64.
- Puglielli, Luigi, Blake C. Ellis, Aleister J. Saunders, et Dora M. Kovacs. 2003. « Ceramide Stabilizes β -Site Amyloid Precursor Protein-Cleaving Enzyme 1 and Promotes Amyloid β -Peptide Biogenesis ». *Journal of Biological Chemistry* 278(22): 19777-83.
- Puzzo, D. et al. 2008. « Picomolar Amyloid- Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus ». *Journal of Neuroscience* 28(53): 14537-45.
- Py, Nathalie A. et al. 2014. « Differential Spatio-Temporal Regulation of MMPs in the 5xFAD Mouse Model of Alzheimer's Disease: Evidence for a pro-Amyloidogenic Role of MT1-MMP ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 6: 247.
- Qian, Qi et al. 2019. « Down-Regulated Expression of MicroRNA-338-5p Contributes to Neuropathology in Alzheimer's Disease ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33(3): 4404-17.
- Qin, Wei et al. 2015. « Elevated Plasma Angiogenesis Factors in Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 45(1): 245-52.

- Radzimanowski, Jens et al. 2008. « Structure of the Intracellular Domain of the Amyloid Precursor Protein in Complex with Fe65-PTB2 ». *EMBO reports* 9(11): 1134-40.
- Rahman, Md Ataur et al. 2020. « Emerging Risk of Environmental Factors: Insight Mechanisms of Alzheimer's Diseases ». *Environmental Science and Pollution Research*. <http://link.springer.com/10.1007/s11356-020-08243-z> (16 avril 2020).
- Rajendran, Lawrence, et Rosa C. Paolicelli. 2018. « Microglia-Mediated Synapse Loss in Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience* 38(12): 2911-19.
- Rama, Nicolas et al. 2012. « Amyloid Precursor Protein Regulates Netrin-1-Mediated Commissural Axon Outgrowth ». *Journal of Biological Chemistry* 287(35): 30014-23.
- Ramos, André. 2008. « Animal Models of Anxiety: Do I Need Multiple Tests? » *Trends in Pharmacological Sciences* 29(10): 493-98.
- Ranaldi, Sébastien et al. 2013. « N-Truncated A β Peptides in Complex Fluids Unraveled by New Specific Immunoassays ». *Neurobiology of Aging* 34(2): 523-39.
- Ranasinghe, Kamalini G. et al. 2020. « Neurophysiological Signatures in Alzheimer's Disease Are Distinctly Associated with TAU, Amyloid- β Accumulation, and Cognitive Decline ». *Science Translational Medicine* 12(534): eaaz4069.
- Rangon, Claire-Marie et al. 2003. « Different Chromogranin Immunoreactivity between Prion and A-Beta Amyloid Plaque ». *NeuroReport* 14(5): 755-58.
- Reale et al. 2020. « Relationship of Wine Consumption with Alzheimer's Disease ». *Nutrients* 12(1): 206.
- Reaux, Annabelle et al. 1999. « Aminopeptidase A inhibitors as potential central antihypertensive agents ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(23): 13415-20.
- Rebeck, G. William, Steven D. Harr, Bradley T. Hyman, et Dudley K. Strickland. 1995. « Multiple, Diverse Senile Plaque-Associated Proteins Are Ligands of an Apolipoprotein e Receptor, the β 2-Macroglobulin Receptor/Low-Density-Lipoprotein Receptor-Related Protein ». *Annals of Neurology* 37(2): 211-17.
- Reddy, P. Hemachandra, et Darryll MA Oliver. 2019a. « Amyloid Beta and Phosphorylated Tau-Induced Defective Autophagy and Mitophagy in Alzheimer's Disease ». *Cells* 8(5): 488.
- . 2019b. « Amyloid Beta and Phosphorylated Tau-Induced Defective Autophagy and Mitophagy in Alzheimer's Disease ». *Cells* 8(5): 488.
- Reinert, Jochim et al. 2016. « Deposition of C-Terminally Truncated A β Species A β 37 and A β 39 in Alzheimer's Disease and Transgenic Mouse Models ». *Acta Neuropathologica Communications* 4(1). <http://actaneurocomms.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40478-016-0294-7> (31 octobre 2018).
- Reinhard, Constanze, Marianne Borgers, Guido David, et Bart De Strooper. 2013. « Soluble Amyloid- β Precursor Protein Binds Its Cell Surface Receptor in a Cooperative Fashion with Glypican and Syndecan Proteoglycans ». *Journal of Cell Science* 126(Pt 21): 4856-61.

- Reiss, Allison B. et al. 2018. « Amyloid toxicity in Alzheimer's disease ». *Reviews in the Neurosciences* 29(6): 613-27.
- Rembach, Alan et al. 2013. « Decreased Copper in Alzheimer's Disease Brain Is Predominantly in the Soluble Extractable Fraction ». *International Journal of Alzheimer's Disease* 2013: 1-7.
- Rice, Heather C. et al. 2019. « Secreted Amyloid- β Precursor Protein Functions as a GABA_B R1a Ligand to Modulate Synaptic Transmission ». *Science* 363(6423): eaao4827.
- Ring, S. et al. 2007. « The Secreted β -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APPs Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice ». *Journal of Neuroscience* 27(29): 7817-26.
- Riva, Antonio et al. 2014. « Truncated CXCL10 Is Associated with Failure to Achieve Spontaneous Clearance of Acute Hepatitis C Infection: RIVA ET AL. ». *Hepatology* 60(2): 487-96.
- Rivera, S. et al. 2010. « Metzincin Proteases and Their Inhibitors: Foes or Friends in Nervous System Physiology? ». *Journal of Neuroscience* 30(46): 15337-57.
- Rivera, Santiago, Laura García-González, Michel Khrestchatisky, et Kévin Baranger. 2019. « Metalloproteinases and Their Tissue Inhibitors in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(16): 3167-91.
- Rodrigue, Karen M. et al. 2013. « Risk Factors for β -Amyloid Deposition in Healthy Aging: Vascular and Genetic Effects ». *JAMA Neurology* 70(5): 600.
- Rogaev, E. I. et al. 1995. « Familial Alzheimer's Disease in Kindreds with Missense Mutations in a Gene on Chromosome 1 Related to the Alzheimer's Disease Type 3 Gene ». *Nature* 376(6543): 775-78.
- Rohe, Michael et al. 2008. « Sortilin-Related Receptor with A-Type Repeats (SORLA) Affects the Amyloid Precursor Protein-Dependent Stimulation of ERK Signaling and Adult Neurogenesis ». *Journal of Biological Chemistry* 283(21): 14826-34.
- Röhrborn, Diana. 2015. « DPP4 in diabetes ». *Frontiers in Immunology* 6.
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00386/abstract> (26 août 2020).
- Roques, B. P. et al. 1980. « The Enkephalinase Inhibitor Thiorphan Shows Antinociceptive Activity in Mice ». *Nature* 288(5788): 286-88.
- Rosenberg, Gary A. 2002. « Matrix Metalloproteinases in Neuroinflammation ». *Glia* 39(3): 279-91.
- Rosenberg, Gary A. 2017. « Extracellular Matrix Inflammation in Vascular Cognitive Impairment and Dementia ». *Clinical Science* 131(6): 425-37.
- von Rotz, R. C. 2004. « The APP Intracellular Domain Forms Nuclear Multiprotein Complexes and Regulates the Transcription of Its Own Precursor ». *Journal of Cell Science* 117(19): 4435-48.
- Rulifson, Ingrid C. et al. 2016. « Identification of Human Islet Amyloid Polypeptide as a BACE2 Substrate ». *PLoS One* 11(2): e0147254.

- Russino, Debora et al. 2013. « The Tachykinin Peptide Neurokinin B Binds Copper Forming an Unusual [CuII(NKB)2] Complex and Inhibits Copper Uptake into 1321N1 Astrocytoma Cells ». *ACS chemical neuroscience* 4(10): 1371-81.
- Ryan, Kathleen A., et Sanjay W. Pimplikar. 2005. « Activation of GSK-3 and Phosphorylation of CRMP2 in Transgenic Mice Expressing APP Intracellular Domain ». *Journal of Cell Biology* 171(2): 327-35.
- Sachse, Carolyn C. et al. 2013. « BACE1 and Presenilin/ γ -Secretase Regulate Proteolytic Processing of KCNE1 and 2, Auxiliary Subunits of Voltage-Gated Potassium Channels ». *FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 27(6): 2458-67.
- Sadleir, Katherine R. et al. 2016. « Presynaptic Dystrophic Neurites Surrounding Amyloid Plaques Are Sites of Microtubule Disruption, BACE1 Elevation, and Increased A β Generation in Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 132(2): 235-56.
- Sagare, Abhay et al. 2007. « Clearance of Amyloid- β by Circulating Lipoprotein Receptors ». *Nature Medicine* 13(9): 1029-31.
- Saido, T. C. et al. 1995. « Dominant and Differential Deposition of Distinct Beta-Amyloid Peptide Species, A Beta N3(PE), in Senile Plaques ». *Neuron* 14(2): 457-66.
- Saido, T. C., W. Yamao-Harigaya, T. Iwatsubo, et S. Kawashima. 1996. « Amino- and Carboxyl-Terminal Heterogeneity of Beta-Amyloid Peptides Deposited in Human Brain ». *Neuroscience Letters* 215(3): 173-76.
- Saido, T., et M. A. Leissring. 2012. « Proteolytic Degradation of Amyloid -Protein ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2(6): a006379-a006379.
- Sakata-Kaneko, S. et al. 2000. « Altered Th1/Th2 Commitment in Human CD4+ T Cells with Ageing ». *Clinical and Experimental Immunology* 120(2): 267-73.
- Sannerud, Ragna et al. 2016. « Restricted Location of PSEN2/ γ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A β Pool ». *Cell* 166(1): 193-208.
- Sarazin, Marie. 2012. « Maladie d'Alzheimer : nouveaux critères de diagnostic clinique ». <https://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/19094.pdf>.
- Sato, Kenya et al. 2020. *A Non-Human Primate Model of Familial Alzheimer's Disease*. Neuroscience. preprint. <http://biorxiv.org/lookup/doi/10.1101/2020.08.24.264259> (13 octobre 2020).
- Satoh-Asahara, Noriko et al. 2013. « A Dipeptidyl Peptidase-4 Inhibitor, Sitagliptin, Exerts Anti-Inflammatory Effects in Type 2 Diabetic Patients ». *Metabolism* 62(3): 347-51.
- Savaskan, Egemen et al. 2001. « Cortical Alterations of Angiotensin Converting Enzyme, Angiotensin II and AT1 Receptor in Alzheimer's Dementia ». *Neurobiology of Aging* 22(4): 541-46.
- Savastano, Adriana et al. 2015. « N-Truncated A β 2-X Starting with Position Two in Sporadic Alzheimer's Disease Cases and Two Alzheimer Mouse Models ». *Journal of Alzheimer's Disease* 49(1): 101-10.

- Scharfenberg, Franka et al. 2019. « Regulation of the Alternative β -Secretase Meprin β by ADAM-Mediated Shedding ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76(16): 3193-3206.
- Schellenberg, G. et al. 1992. « Genetic Linkage Evidence for a Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome 14 ». *Science* 258(5082): 668-71.
- Schilling, Stephan et al. 2004. « Glutaminyl Cyclases Unfold Glutamyl Cyclase Activity under Mild Acid Conditions ». *FEBS Letters* 563(1-3): 191-96.
- . 2008. « Glutaminyl Cyclase Inhibition Attenuates Pyroglutamate A β and Alzheimer's Disease-like Pathology ». *Nature Medicine* 14(10): 1106-11.
- Schlenzig, Dagmar et al. 2009. « Pyroglutamate Formation Influences Solubility and Amyloidogenicity of Amyloid Peptides ». *Biochemistry* 48(29): 7072-78.
- . 2018. « Dipeptidyl-Peptidase Activity of Meprin β Links N-truncation of A β with Glutaminyl Cyclase-Catalyzed pGlu-A β Formation » éd. Stefan Lichtenthaler. *Journal of Alzheimer's Disease* 66(1): 359-75.
- Schneider, Ronald, Judith Osterburg, Axel Buchner, et Reinhard Pietrowsky. 2009. « Effect of Intranasally Administered Cholecystokinin on Encoding of Controlled and Automatic Memory Processes ». *Psychopharmacology* 202(4): 559-67.
- Schönherr, Caroline et al. 2016. « Generation of Aggregation Prone N-Terminally Truncated Amyloid β Peptides by Meprin β Depends on the Sequence Specificity at the Cleavage Site ». *Molecular Neurodegeneration* 11(1).
<http://www.molecularneurodegeneration.com/content/11/1/19> (30 octobre 2018).
- Schubert, M. Pras, M., D. Zucker-Franklin, A. Rimon, et E. C. Franklin. 1968. « The Characterization of Soluble Amyloid Prepared in Water ». *Journal of Clinical Investigation* 47(4): 924-33.
- Schwarz, Adam J. et al. 2018. « Topographic Staging of Tau Positron Emission Tomography Images ». *Alzheimer's & Dementia: Diagnosis, Assessment & Disease Monitoring* 10(1): 221-31.
- Scott, Lesley J. 2017. « Sitagliptin: A Review in Type 2 Diabetes ». *Drugs* 77(2): 209-24.
- Sensi, Stefano L., Alberto Granzotto, Mariacristina Siotto, et Rosanna Squitti. 2018. « Copper and Zinc Dysregulation in Alzheimer's Disease ». *Trends in Pharmacological Sciences* 39(12): 1049-63.
- Sergeant, Nicolas et al. 2003. « Truncated Beta-Amyloid Peptide Species in Pre-Clinical Alzheimer's Disease as New Targets for the Vaccination Approach: β -Amyloid Peptides in Early Amyloid Deposits ». *Journal of Neurochemistry* 85(6): 1581-91.
- Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, E. Masliah, et B. T. Hyman. 2011. « Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1(1): a006189-a006189.
- Sevalle, Jean et al. 2009. « Aminopeptidase A Contributes to the N-Terminal Truncation of Amyloid β -Peptide ». *Journal of Neurochemistry* 109(1): 248-56.
- Shao, Shiyong et al. 2020. « Dipeptidyl Peptidase 4 Inhibitors and Their Potential Immune Modulatory Functions ». *Pharmacology & Therapeutics* 209: 107503.

- Shariati, S. Ali M., et Bart De Strooper. 2013. « Redundancy and Divergence in the Amyloid Precursor Protein Family ». *FEBS Letters* 587(13): 2036-45.
- Sharoar, Md Golam, et Riqiang Yan. 2017. « Effects of altered RTN3 expression on BACE1 activity and Alzheimer's neuritic plaques ». *Reviews in the Neurosciences* 28(2).
<https://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2017.28.issue-2/revneuro-2016-0054/revneuro-2016-0054.xml> (27 mars 2020).
- Sharoyan, Svetlana et al. 2013a. « Interaction of Dipeptidyl Peptidase IV with Amyloid Peptides ». *Neurochemistry International* 62(8): 1048-54.
- . 2013b. « Interaction of Dipeptidyl Peptidase IV with Amyloid Peptides ». *Neurochemistry International* 62(8): 1048-54.
- Sheehan, Patrick W., et Erik S. Musiek. 2020. « Evaluating Circadian Dysfunction in Mouse Models of Alzheimer's Disease: Where Do We Stand? » *Frontiers in Neuroscience* 14: 703.
- Shi, Jing-Ming et al. 2019. « Endosomal PH Favors Shedding of Membrane-inserted Amyloid- β Peptide ». *Protein Science* 28(5): 889-99.
- Shi, Sen, Daisuke Koya, et Keizo Kanasaki. 2016. « Dipeptidyl Peptidase-4 and Kidney Fibrosis in Diabetes ». *Fibrogenesis & Tissue Repair* 9(1): 1.
- Shi, Xiao-Ping et al. 2003. « β -Secretase Cleavage at Amino Acid Residue 34 in the Amyloid β Peptide Is Dependent upon γ -Secretase Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 278(23): 21286-94.
- Shimshek, Derya R. et al. 2016. « Pharmacological BACE1 and BACE2 Inhibition Induces Hair Depigmentation by Inhibiting PMEL17 Processing in Mice ». *Scientific Reports* 6: 21917.
- Shoji, M et al. 1992. « Production of the Alzheimer Amyloid Beta Protein by Normal Proteolytic Processing ». *Science* 258(5079): 126-29.
- Shukla, Varsha, Susan Skuntz, et Harish C. Pant. 2012. « Deregulated Cdk5 Activity Is Involved in Inducing Alzheimer's Disease ». *Archives of Medical Research* 43(8): 655-62.
- Sichler, Marius E. et al. 2019. « Reduced Acoustic Startle Response and Prepulse Inhibition in the Tg4-42 Model of Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease Reports* 3(1): 269-78.
- Sikanyika, Nkumbu L., Helena C. Parkinson, A. Ian Smith, et Sanjaya Kuruppu. 2019. « Powering Amyloid Beta Degrading Enzymes: A Possible Therapy for Alzheimer's Disease ». *Neurochemical Research* 44(6): 1289-96.
- Sinha, Sukanto et al. 1999. « Purification and Cloning of Amyloid Precursor Protein β -Secretase from Human Brain ». *Nature* 402(6761): 537-40.
- Smith, D. L. et al. 2009. « Reversal of Long-Term Dendritic Spine Alterations in Alzheimer Disease Models ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(39): 16877-82.
- Söllvander, Sofia et al. 2016. « Accumulation of Amyloid- β by Astrocytes Result in Enlarged Endosomes and Microvesicle-Induced Apoptosis of Neurons ». *Molecular Neurodegeneration* 11(1): 38.

- Song, Moshi et al. 2015. « Mitochondrial Fission and Fusion Factors Reciprocally Orchestrate Mitophagic Culling in Mouse Hearts and Cultured Fibroblasts ». *Cell Metabolism* 21(2): 273-86.
- Song, Sungmin et al. 2008. « E2-25K/Hip-2 Regulates Caspase-12 in ER Stress–Mediated A β Neurotoxicity ». *Journal of Cell Biology* 182(4): 675-84.
- Song, Yuanli, Eric J. Hustedt, Suzanne Brandon, et Charles R. Sanders. 2013. « Competition Between Homodimerization and Cholesterol Binding to the C99 Domain of the Amyloid Precursor Protein ». *Biochemistry* 52(30): 5051-64.
- Sosa, Lucas J. et al. 2013. « Amyloid Precursor Protein Is an Autonomous Growth Cone Adhesion Molecule Engaged in Contact Guidance » éd. Zhongcong Xie. *PLoS ONE* 8(5): e64521.
- . 2017. « The Physiological Role of the Amyloid Precursor Protein as an Adhesion Molecule in the Developing Nervous System ». *Journal of Neurochemistry* 143(1): 11-29.
- Soscia, Stephanie J. et al. 2010. « The Alzheimer’s Disease-Associated Amyloid β -Protein Is an Antimicrobial Peptide » éd. Ashley I. Bush. *PLoS ONE* 5(3): e9505.
- Spampinato, Simona Federica et al. 2017. « Astrocytes Contribute to A β -Induced Blood-Brain Barrier Damage through Activation of Endothelial MMP9 ». *Journal of Neurochemistry* 142(3): 464-77.
- Speth, Robert C., et Vardan T. Karamyan. 2008. « The Significance of Brain Aminopeptidases in the Regulation of the Actions of Angiotensin Peptides in the Brain ». *Heart Failure Reviews* 13(3): 299-309.
- St George-Hyslop, P. H. et al. 1987. « Absence of Duplication of Chromosome 21 Genes in Familial and Sporadic Alzheimer’s Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 238(4827): 664-66.
- Stefaniak, Ewelina, et Wojciech Bal. 2019. « Cu^{II} Binding Properties of N-Truncated A β Peptides: In Search of Biological Function ». *Inorganic Chemistry* 58(20): 13561-77.
- Steiner, Harald, Akio Fukumori, Shinji Tagami, et Masayasu Okochi. 2018. « Making the final cut: pathogenic amyloid- β peptide generation by γ -secretase ». *Cell Stress* 2(11): 292-310.
- Sterniczuk, Roxanne, Michael C. Antle, Frank M. LaFerla, et Richard H. Dyck. 2010. « Characterization of the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer’s Disease: Part 2. Behavioral and Cognitive Changes ». *Brain Research* 1348: 149-55.
- Stoccoro, Andrea, et Fabio Coppedè. 2018. « Role of Epigenetics in Alzheimer’s Disease Pathogenesis ». *Neurodegenerative Disease Management* 8(3): 181-93.
- Stover, Kurt R., Mackenzie A. Campbell, Christine M. Van Winssen, et Richard E. Brown. 2015. « Early Detection of Cognitive Deficits in the 3xTg-AD Mouse Model of Alzheimer’s Disease ». *Behavioural Brain Research* 289: 29-38.
- Strupp, C. et al. 2007. « A Pilot Study of Bendamustine in Elderly Patients with High-Risk MDS and AML ». *Leukemia & Lymphoma* 48(6): 1161-66.

- Suganuma, Takayasu et al. 2004. « Regulation of Aminopeptidase A Expression in Cervical Carcinoma: Role of Tumor–Stromal Interaction and Vascular Endothelial Growth Factor ». *Laboratory Investigation* 84(5): 639-48.
- Suidan, Georgette L., et Gayathri Ramaswamy. 2019. « Targeting Apolipoprotein E for Alzheimer's Disease: An Industry Perspective ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(9): 2161.
- Sullivan, Christopher P. et al. 2011. « Pyroglutamate-A β 3 and 11 Colocalize in Amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Cerebral Cortex with Pyroglutamate-A β 11 Forming the Central Core ». *Neuroscience Letters* 505(2): 109-12.
- Sultzer, David L. et al. 2014. « Neurobiology of Delusions, Memory, and Insight in Alzheimer Disease ». *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 22(11): 1346-55.
- Sumioka, Akio et al. 2005. « Role of 14-3-3 γ in FE65-Dependent Gene Transactivation Mediated by the Amyloid β -Protein Precursor Cytoplasmic Fragment ». *Journal of Biological Chemistry* 280(51): 42364-74.
- Sun, Linfeng, Rui Zhou, Guanghui Yang, et Yigong Shi. 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 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114(4): E476-85.
- Sun, Qiyang et al. 2017. « Alzheimer's Disease: From Genetic Variants to the Distinct Pathological Mechanisms ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 319.
- Sun, Xiulian, Guiqiong He, et Weihong Song. 2006. « BACE2, as a Novel APP Θ -secretase, Is Not Responsible for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease in Down Syndrome ». *The FASEB Journal* 20(9): 1369-76.
- Sung, You Me et al. 2013. « Mercaptoacetamide-Based Class II HDAC Inhibitor Lowers A β Levels and Improves Learning and Memory in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Experimental Neurology* 239: 192-201.
- Swerdlow, Russell H. 2018. « Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease » éd. George Perry, Jesus Avila, Massimo Tabaton, et Xiongwei Zhu. *Journal of Alzheimer's Disease* 62(3): 1403-16.
- Szaruga, Maria et al. 2017. « Alzheimer's-Causing Mutations Shift A β Length by Destabilizing γ -Secretase-A β n Interactions ». *Cell* 170(3): 443-456.e14.
- Takahashi, Reisuke H. et al. 2002. « Intraneuronal Alzheimer A β 42 Accumulates in Multivesicular Bodies and Is Associated with Synaptic Pathology ». *The American Journal of Pathology* 161(5): 1869-79.
- Takahashi, Reisuke H., Toshitaka Nagao, et Gunnar K. Gouras. 2017. « Plaque Formation and the Intraneuronal Accumulation of β -Amyloid in Alzheimer's Disease: Intraneuronal Accumulation of β -Amyloid ». *Pathology International* 67(4): 185-93.
- Takami, M. et al. 2009. « γ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of β -Carboxyl Terminal Fragment ». *Journal of Neuroscience* 29(41): 13042-52.

- Takashima, Akihiko, Benjamin Wolozin, et Luc Buee, éd. 2019. 1184 *Tau Biology*. Singapore: Springer Singapore. <http://link.springer.com/10.1007/978-981-32-9358-8> (21 avril 2020).
- Takasugi, Nobumasa et al. 2018. « TMEM30A Is a Candidate Interacting Partner for the β -Carboxyl-Terminal Fragment of Amyloid- β Precursor Protein in Endosomes » éd. Madepalli K. Lakshmana. *PLOS ONE* 13(8): e0200988.
- Takayama, Ken-ichi, Kyoko Fujiwara, et Satoshi Inoue. 2019. « Amyloid Precursor Protein, an Androgen-regulated Gene, Is Targeted by RNA-binding Protein PSF/SFPQ in Neuronal Cells ». *Genes to Cells* 24(11): 719-30.
- Tamayev, Robert, Dawang Zhou, et Luciano D'Adamio. 2009. « The Interactome of the Amyloid β Precursor Protein Family Members Is Shaped by Phosphorylation of Their Intracellular Domains ». *Molecular Neurodegeneration* 4(1): 28.
- Tan, Valerie T. Y. et al. 2018. « Lentivirus-Mediated Expression of Human Secreted Amyloid Precursor Protein-Alpha Prevents Development of Memory and Plasticity Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Molecular Brain* 11(1): 7.
- Tang, Bor Luen. 2019. « Amyloid Precursor Protein (APP) and GABAergic Neurotransmission ». *Cells* 8(6): 550.
- Tank, Elizabeth M. H., et Heather L. True. 2009. « Disease-Associated Mutant Ubiquitin Causes Proteasomal Impairment and Enhances the Toxicity of Protein Aggregates » éd. Sue Biggins. *PLoS Genetics* 5(2): e1000382.
- Tanzi, R. E. et al. 1987. « Amyloid Beta Protein Gene: CDNA, MRNA Distribution, and Genetic Linkage near the Alzheimer Locus ». *Science (New York, N.Y.)* 235(4791): 880-84.
- Tanzi, Rudolph E. et al. 1987. « The Genetic Defect in Familial Alzheimer's Disease Is Not Tightly Linked to the Amyloid β -Protein Gene ». *Nature* 329(6135): 156-57.
- . 2012. « A Brief History of Alzheimer's Disease Gene Discovery » éd. George Perry et al. *Journal of Alzheimer's Disease* 33(s1): S5-13.
- Tatullo, Marco et al. 2019. « From Mouth to Brain: Neuroendocrine Markers Play as a Crosstalk Among Oral and Neurodegenerative Diseases ». *Frontiers in Endocrinology* 10: 378.
- Taylor, Chanel J. et al. 2008. « Endogenous Secreted Amyloid Precursor Protein- α Regulates Hippocampal NMDA Receptor Function, Long-Term Potentiation and Spatial Memory ». *Neurobiology of Disease* 31(2): 250-60.
- Thal, Dietmar Rudolf et al. 1999. « Fleecy Amyloid Deposits in the Internal Layers of the Human Entorhinal Cortex Are Comprised of N-Terminal Truncated Fragments of A β ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58(2): 210-16.
- the European Alzheimer's Disease Initiative Investigators et al. 2009. « Genome-Wide Association Study Identifies Variants at CLU and CR1 Associated with Alzheimer's Disease ». *Nature Genetics* 41(10): 1094-99.
- Theendakara, Veena, Clare A. Peters-Libeu, Dale E. Bredesen, et Rammohan V. Rao. 2018. « Transcriptional Effects of ApoE4: Relevance to Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurobiology* 55(6): 5243-54.

- « Thérapeutiques sur Alzforum ». https://www.alzforum.org/therapeutics/search?fda_statuses=&target_types=&therapy_types=&conditions%5B%5D=145&keywords-entry=&keywords=.
- Thinakaran, Gopal, et Edward H. Koo. 2008. « Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function ». *Journal of Biological Chemistry* 283(44): 29615-19.
- van Tijn, Paula et al. 2012. « Mutant Ubiquitin Decreases Amyloid β Plaque Formation in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Neurochemistry International* 61(5): 739-48.
- Townsend, Matthew et al. 2006. « Effects of Secreted Oligomers of Amyloid β -Protein on Hippocampal Synaptic Plasticity: A Potent Role for Trimers: Amyloid β -Protein and Hippocampal Synaptic Plasticity ». *The Journal of Physiology* 572(2): 477-92.
- Tsujimoto, Masafumi, Yoshikuni Goto, Masato Maruyama, et Akira Hattori. 2008. « Biochemical and Enzymatic Properties of the M1 Family of Aminopeptidases Involved in the Regulation of Blood Pressure ». *Heart Failure Reviews* 13(3): 285-91.
- Turdu, Gulmira, Hongwei Gao, Yingying Jiang, et Madina Kabas. 2018. « Plant Dipeptidyl Peptidase-IV Inhibitors as Antidiabetic Agents: A Brief Review ». *Future Medicinal Chemistry* 10(10): 1229-39.
- Uddin, Md. Sahab et al. 2018. « Autophagic Dysfunction in Alzheimer's Disease: Cellular and Molecular Mechanistic Approaches to Halt Alzheimer's Pathogenesis: UDDIN ET AL. » *Journal of Cellular Physiology*. <http://doi.wiley.com/10.1002/jcp.27588> (30 octobre 2018).
- Ulland, Tyler K., et Marco Colonna. 2018. « TREM2 — a Key Player in Microglial Biology and Alzheimer Disease ». *Nature Reviews Neurology* 14(11): 667-75.
- Ulmer, A. J. et al. 1990. « CD26 Antigen Is a Surface Dipeptidyl Peptidase IV (DPPIV) as Characterized by Monoclonal Antibodies Clone Til-19-4-7 and 4EL1C7 ». *Scandinavian Journal of Immunology* 31(4): 429-35.
- « Unité de soins, d'évaluation et de prise en charge, Alzheimer- Livre Blanc ». 2018. <https://www.uspalz.com/livre-blanc-2018/>.
- Vaillant-Beuchot, Loan et al. 2020. « Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains ». *Acta Neuropathologica* (2234): 27.
- Vanacore, Nicola. *Dementia in Europe Yearbook 2019*. <https://www.alzheimer-europe.org/Publications/Dementia-in-Europe-Yearbooks>.
- van der Kant, Rik, et Lawrence S.B. Goldstein. 2015. « Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia ». *Developmental Cell* 32(4): 502-15.
- Vandermeeren, Marc et al. 2001. « The Functional γ -Secretase Inhibitor Prevents Production of Amyloid β 1–34 in Human and Murine Cell Lines ». *Neuroscience Letters* 315(3): 145-48.
- Varga, Edina et al. 2014. « Abeta(1-42) Enhances Neuronal Excitability in the CA1 via NR2B Subunit-Containing NMDA Receptors ». *Neural Plasticity* 2014: 1-12.

- Vassar, R., D. M. Kovacs, R. Yan, et P. C. Wong. 2009. « The γ -Secretase Enzyme BACE in Health and Alzheimer's Disease: Regulation, Cell Biology, Function, and Therapeutic Potential ». *Journal of Neuroscience* 29(41): 12787-94.
- Verheijen, Jan, et Kristel Slegers. 2018. « Understanding Alzheimer Disease at the Interface between Genetics and Transcriptomics ». *Trends in Genetics* 34(6): 434-47.
- Vingtdeux, Valérie et al. 2007. « Intracellular PH Regulates Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Accumulation ». *Neurobiology of Disease* 25(3): 686-96.
- Viswanathan, Jayashree et al. 2013. « Ubiquilin-1 Modulates γ -Secretase-Mediated ϵ -Site Cleavage in Neuronal Cells ». *Biochemistry* 52(22): 3899-3912.
- Von Bertalanffy, L. 1954. « Rudolph Virchow, 1821-1902 ». *Canadian Medical Association Journal* 70(5): 581.
- Voytyuk, Iryna, Bart De Strooper, et Lucía Chávez-Gutiérrez. 2018. « Modulation of γ - and β -Secretases as Early Prevention Against Alzheimer's Disease ». *Biological Psychiatry* 83(4): 320-27.
- Wagner, Jannek M. et al. 2019. « Analysis of Motor Function in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13: 107.
- Wagner, Steven L. et al. 2017. « Pharmacological and Toxicological Properties of the Potent Oral γ -Secretase Modulator BPN-15606 ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 362(1): 31-44.
- Walter, Susanne et al. 2019. « The Metalloprotease ADAMTS4 Generates N-Truncated A β 4-x Species and Marks Oligodendrocytes as a Source of Amyloidogenic Peptides in Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 137(2): 239-57.
- Wang, P. 2005. « Defective Neuromuscular Synapses in Mice Lacking Amyloid Precursor Protein (APP) and APP-Like Protein 2 ». *Journal of Neuroscience* 25(5): 1219-25.
- Wang, Rong et al. 2012. « Lys(203) and Lys(382) Are Essential for the Proteasomal Degradation of BACE1 ». *Current Alzheimer Research* 9(5): 606-15.
- Wang, Tao et al. 2020. « A Phase II Randomized Trial of Sodium Oligomannate in Alzheimer's Dementia ». *Alzheimer's Research & Therapy* 12(1): 110.
- Wang, X. et al. 2014. « FoxO Mediates APP-Induced AICD-Dependent Cell Death ». *Cell Death & Disease* 5: e1233.
- Wang, Yaming et al. 2015. « TREM2 Lipid Sensing Sustains the Microglial Response in an Alzheimer's Disease Model ». *Cell* 160(6): 1061-71.
- Wang, Zhe et al. 2019. « BACE2, a Conditional β -Secretase, Contributes to Alzheimer's Disease Pathogenesis ». *JCI Insight* 4(1): e123431.
- Wang, Zhi-Hao et al. 2018. « Delta-Secretase (AEP) Mediates Tau-Splicing Imbalance and Accelerates Cognitive Decline in Tauopathies ». *Journal of Experimental Medicine* 215(12): 3038-56.

- Weber, Stewart A., Ranish K. Patel, et Helmi L. Lutsep. 2018. « Cerebral Amyloid Angiopathy: Diagnosis and Potential Therapies ». *Expert Review of Neurotherapeutics* 18(6): 503-13.
- Weggen, Sascha et al. 2001. « A Subset of NSAIDs Lower Amyloidogenic A β 42 Independently of Cyclooxygenase Activity ». *Nature* 414(6860): 212-16.
- Weingarten, M. D., A. H. Lockwood, S. Y. Hwo, et M. W. Kirschner. 1975. « A Protein Factor Essential for Microtubule Assembly ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(5): 1858-62.
- Weng, Guohu et al. 2019. « Sitagliptin Promotes Mitochondrial Biogenesis in Human SH-SY5Y Cells by Increasing the Expression of PGC-1 α /NRF1/TFAM ». *IUBMB Life* 71(10): 1515-21.
- Weyer, Sascha W et al. 2011. « APP and APLP2 Are Essential at PNS and CNS Synapses for Transmission, Spatial Learning and LTP: APP and APLP2 Synergize for Synaptic Function ». *The EMBO Journal* 30(11): 2266-80.
- Wiciński, Michał et al. 2018. « Neuroprotective Activity of Sitagliptin via Reduction of Neuroinflammation beyond the Incretin Effect: Focus on Alzheimer's Disease ». *BioMed Research International* 2018: 1-9.
- Wiels, Wietse, Chris Baeken, et Sebastiaan Engelborghs. 2020. « Depressive Symptoms in the Elderly—An Early Symptom of Dementia? A Systematic Review ». *Frontiers in Pharmacology* 11: 34.
- Wildburger, Norelle C. et al. 2017. « Diversity of Amyloid-Beta Proteoforms in the Alzheimer's Disease Brain ». *Scientific Reports* 7(1): 9520.
- Wilkins, Heather M., et Russell H. Swerdlow. 2017. « Amyloid Precursor Protein Processing and Bioenergetics ». *Brain Research Bulletin* 133: 71-79.
- Willem, Michael et al. 2015. « η -Secretase Processing of APP Inhibits Neuronal Activity in the Hippocampus ». *Nature* 526(7573): 443-47.
- Wiltfang, J. et al. 2002. « Highly Conserved and Disease-Specific Patterns of Carboxyterminally Truncated A β Peptides 1-37/38/39 in Addition to 1-40/42 in Alzheimer's Disease and in Patients with Chronic Neuroinflammation ». *Journal of Neurochemistry* 81(3): 481-96.
- Wiltfang, Jens et al. 2001. « Elevation of β -Amyloid Peptide 2-42 in Sporadic and Familial Alzheimer's Disease and Its Generation in PS1 Knockout Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 276(46): 42645-57.
- Wirhth, Oliver et al. 2009. « Intraneuronal Pyroglutamate-A β 3-42 Triggers Neurodegeneration and Lethal Neurological Deficits in a Transgenic Mouse Model ». *Acta Neuropathologica* 118(4): 487-96.
- Wirhth, Oliver, Christian Erck, et al. 2010. « Identification of Low Molecular Weight Pyroglutamate A β Oligomers in Alzheimer Disease: A NOVEL TOOL FOR THERAPY AND DIAGNOSIS ». *Journal of Biological Chemistry* 285(53): 41517-24.
- Wirhth, Oliver, Tobias Bethge, et al. 2010. « Pyroglutamate A β Pathology in APP/PS1KI Mice, Sporadic and Familial Alzheimer's Disease Cases ». *Journal of Neural Transmission* 117(1): 85-96.

- Wirhys, Oliver et al. 2013. « Oligomeric Pyroglutamate Amyloid- β is Present in Microglia and a Subfraction of Vessels in Patients with Alzheimer's Disease: Implications for Immunotherapy ». *Journal of Alzheimer's Disease* 35(4): 741-49.
- . 2017. « N-Truncated A β 4-x Peptides in Sporadic Alzheimer's Disease Cases and Transgenic Alzheimer Mouse Models ». *Alzheimer's Research & Therapy* 9(1).
<http://alzres.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13195-017-0309-z> (13 novembre 2018).
- Wisniewski, T. et al. 1998. « A Novel Polish Presenilin-1 Mutation (P117L) Is Associated with Familial Alzheimer's Disease and Leads to Death as Early as the Age of 28 Years ». *Neuroreport* 9(2): 217-21.
- Wittnam, Jessica L. et al. 2012. « Pyroglutamate Amyloid β (A β) Aggravates Behavioral Deficits in Transgenic Amyloid Mouse Model for Alzheimer Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 287(11): 8154-62.
- Wolfe, Cody et al. 2018. « The Role of APOE and TREM2 in Alzheimer's Disease—Current Understanding and Perspectives ». *International Journal of Molecular Sciences* 20(1): 81.
- Wolfe, Michael S. 2009. « γ -Secretase in Biology and Medicine ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20(2): 219-24.
- . 2010. « Structure, mechanism and inhibition of γ -secretase and presenilin-like proteases ». *Biological Chemistry* 391(8). <http://www.degruyter.com/view/j/bchm.2010.391.issue-8/bc.2010.086/bc.2010.086.xml> (6 mai 2020).
- . 2019a. « Dysfunctional γ -Secretase in Familial Alzheimer's Disease ». *Neurochemical Research* 44(1): 5-11.
- . 2019b. « Structure and Function of the γ -Secretase Complex ». *Biochemistry* 58(27): 2953-66.
- Wright, John W., et Joseph W. Harding. 2019. « Contributions by the Brain Renin-Angiotensin System to Memory, Cognition, and Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 67(2): 469-80.
- Wu, Zhou et al. 2013. « Differential Pathways for Interleukin-1 β Production Activated by Chromogranin A and Amyloid β in Microglia ». *Neurobiology of Aging* 34(12): 2715-25.
- Xiao, Q. et al. 2014. « Enhancing Astrocytic Lysosome Biogenesis Facilitates A Clearance and Attenuates Amyloid Plaque Pathogenesis ». *Journal of Neuroscience* 34(29): 9607-20.
- Xie, Jiayang et al. 2020. « Progress in Target Drug Molecules for Alzheimer's Disease ». *Current Topics in Medicinal Chemistry* 20(1): 4-36.
- Xin, Shu-Hui et al. 2018a. « Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: From Mechanisms to Therapy ». *Neurotoxicity Research* 34(3): 733-48.
- . 2018b. « Clearance of Amyloid Beta and Tau in Alzheimer's Disease: From Mechanisms to Therapy ». *Neurotoxicity Research* 34(3): 733-48.
- Xu, Wei, Lan Tan, et Jin-Tai Yu. 2015. « The Role of PICALM in Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurobiology* 52(1): 399-413.

- Yan, R. et al. 2001. « The Transmembrane Domain of the Alzheimer's Beta-Secretase (BACE1) Determines Its Late Golgi Localization and Access to Beta -Amyloid Precursor Protein (APP) Substrate ». *The Journal of Biological Chemistry* 276(39): 36788-96.
- Yan, Riqiang. 2017. « Physiological Functions of the β -Site Amyloid Precursor Protein Cleaving Enzyme 1 and 2 ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10.
<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2017.00097/full> (27 mars 2020).
- Yan, Shi Du et al. 1996. « RAGE and Amyloid- β Peptide Neurotoxicity in Alzheimer's Disease ». *Nature* 382(6593): 685-91.
- Yang, Jie et al. 2020. « Synthesis and Biological Evaluation of 3-Arylbenzofuranone Derivatives as Potential Anti-Alzheimer's Disease Agents ». *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry* 35(1): 805-14.
- Yang, Shengchang et al. 2013. « Effects of Cholecystokinin-8 on Morphine-Induced Spatial Reference Memory Impairment in Mice ». *Behavioural Brain Research* 256: 346-53.
- Yang, Yang, Chang Liu, Yi-Lun Lin, et Fang Li. 2013. « Structural Insights into Central Hypertension Regulation by Human Aminopeptidase A ». *Journal of Biological Chemistry* 288(35): 25638-45.
- Yasojima, Koji, Haruhiko Akiyama, Edith G McGeer, et Patrick L McGeer. 2001. « Reduced Nephilysin in High Plaque Areas of Alzheimer Brain: A Possible Relationship to Deficient Degradation of β -Amyloid Peptide ». *Neuroscience Letters* 297(2): 97-100.
- Yeh, Felix L. et al. 2016. « TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia ». *Neuron* 91(2): 328-40.
- Yin, K.-J. et al. 2006. « Matrix Metalloproteinases Expressed by Astrocytes Mediate Extracellular Amyloid-Beta Peptide Catabolism ». *Journal of Neuroscience* 26(43): 10939-48.
- Yoshimoto, M. et al. 1995. « NACP, the Precursor Protein of the Non-Amyloid Beta/A4 Protein (A Beta) Component of Alzheimer Disease Amyloid, Binds A Beta and Stimulates A Beta Aggregation. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 92(20): 9141-45.
- Young-Pearse, T. L. et al. 2007. « A Critical Function for -Amyloid Precursor Protein in Neuronal Migration Revealed by In Utero RNA Interference ». *Journal of Neuroscience* 27(52): 14459-69.
- Young-Pearse, Tracy L et al. 2008. « Secreted APP Regulates the Function of Full-Length APP in Neurite Outgrowth through Interaction with Integrin Beta1 ». *Neural Development* 3(1): 15.
- Youssef, Ihsen et al. 2008. « N-Truncated Amyloid-Beta Oligomers Induce Learning Impairment and Neuronal Apoptosis ». *Neurobiology of Aging* 29(9): 1319-33.
- Yu, Denise M. T., Xin M. Wang, Geoffrey W. McCaughan, et Mark D. Gorrell. 2006. « Extraenzymatic Functions of the Dipeptidyl Peptidase IV-Related Proteins DP8 and DP9 in Cell Adhesion, Migration and Apoptosis: Functions of Dipeptidyl Peptidases, DP8 and DP9 ». *FEBS Journal* 273(11): 2447-60.
- Yu, Gang et al. 2000. « Nicastrin Modulates Presenilin-Mediated Notch/Glp-1 Signal Transduction and BAPP Processing ». *Nature* 407(6800): 48-54.

- Yu, Jin-Tai, Lan Tan, et John Hardy. 2014. « Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease: An Update ». *Annual Review of Neuroscience* 37(1): 79-100.
- Yu, Yang, et Richard D. Ye. 2015. « Microglial A β Receptors in Alzheimer's Disease ». *Cellular and Molecular Neurobiology* 35(1): 71-83.
- Yuan, Xiang-Zhen et al. 2017. « The Role of ADAM10 in Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 58(2): 303-22.
- Yuksel, Melike, et Ozden Tacal. 2019. « Trafficking and Proteolytic Processing of Amyloid Precursor Protein and Secretases in Alzheimer's Disease Development: An up-to-Date Review ». *European Journal of Pharmacology* 856: 172415.
- Zare-shahabadi, Ameneh, Eliezer Masliah, Gail V.W. Johnson, et Nima Rezaei. 2015a. « Autophagy in Alzheimer's disease ». *Reviews in the Neurosciences* 26(4).
<https://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2015.26.issue-4/revneuro-2014-0076/revneuro-2014-0076.xml> (22 avril 2020).
- . 2015b. « Autophagy in Alzheimer's disease ». *Reviews in the Neurosciences* 26(4).
<https://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2015.26.issue-4/revneuro-2014-0076/revneuro-2014-0076.xml> (22 avril 2020).
- Zhang, Dan et al. 2009. « Two Chromogranin A-Derived Peptides Induce Calcium Entry in Human Neutrophils by Calmodulin-Regulated Calcium Independent Phospholipase A2 » éd. Mauricio Rojas. *PLoS ONE* 4(2): e4501.
- Zhang, Kangling et al. 2012. « Targeted Proteomics for Quantification of Histone Acetylation in Alzheimer's Disease ». *PROTEOMICS* 12(8): 1261-68.
- Zhang, Yi-dan, et Jian-jun Zhao. 2015. « TFEB Participates in the A β -Induced Pathogenesis of Alzheimer's Disease by Regulating the Autophagy-Lysosome Pathway ». *DNA and Cell Biology* 34(11): 661-68.
- Zhang, Yi-Jiong et al. 2012. « Intra-Membrane Oligomerization and Extra-Membrane Oligomerization of Amyloid- β Peptide Are Competing Processes as a Result of Distinct Patterns of Motif Interplay ». *Journal of Biological Chemistry* 287(1): 748-56.
- Zhang, Yuan et al. 2017. « The role of ubiquitin proteasomal system and autophagy-lysosome pathway in Alzheimer's disease ». *Reviews in the Neurosciences* 28(8).
<http://www.degruyter.com/view/j/revneuro.2017.28.issue-8/revneuro-2017-0013/revneuro-2017-0013.xml> (26 août 2020).
- Zhang, Yun-wu et al. 2005. « Nicastrin Is Critical for Stability and Trafficking but Not Association of Other Presenilin/ γ -Secretase Components ». *Journal of Biological Chemistry* 280(17): 17020-26.
- Zhang, Zhentao et al. 2015. « Delta-Secretase Cleaves Amyloid Precursor Protein and Regulates the Pathogenesis in Alzheimer's Disease ». *Nature Communications* 6(1): 8762.
- . 2018. « δ -Secretase-Cleaved Tau Stimulates A β Production via Upregulating STAT1-BACE1 Signaling in Alzheimer's Disease ». *Molecular Psychiatry*.

- Zhang, Zhentao, Ye Tian, et Keqiang Ye. 2020. « δ -Secretase in Neurodegenerative Diseases: Mechanisms, Regulators and Therapeutic Opportunities ». *Translational Neurodegeneration* 9(1): 1.
- Zhao, Hong et al. 2009. « Bioluminescence Imaging Reveals Inhibition of Tumor Cell Proliferation by Alzheimer's Amyloid Beta Protein ». *Cancer Cell International* 9(1): 15.
- Zhao, Jinying et al. 2017. « A Genome-Wide Profiling of Brain DNA Hydroxymethylation in Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia* 13(6): 674-88.
- Zhao, Zhen et al. 2015. « Central Role for PICALM in Amyloid- β Blood-Brain Barrier Transcytosis and Clearance ». *Nature Neuroscience* 18(7): 978-87.
- Zhong, Jixin, et Sanjay Rajagopalan. 2015. « Dipeptidyl Peptidase-4 Regulation of SDF-1/CXCR4 Axis: Implications for Cardiovascular Disease ». *Frontiers in Immunology* 6.
<http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fimmu.2015.00477/abstract> (28 août 2020).
- Zhou, Rui et al. 2019. « Recognition of the Amyloid Precursor Protein by Human γ -Secretase ». *Science* 363(6428): eaaw0930.