



**HAL**  
open science

# Étude du rôle neuronal des isoformes du facteur de risque génétique BIN1 dans la maladie d'Alzheimer

Erwan Lambert

► **To cite this version:**

Erwan Lambert. Étude du rôle neuronal des isoformes du facteur de risque génétique BIN1 dans la maladie d'Alzheimer. Biologie moléculaire. Université de Lille, 2023. Français. NNT : 2023ULILS106 . tel-04352404

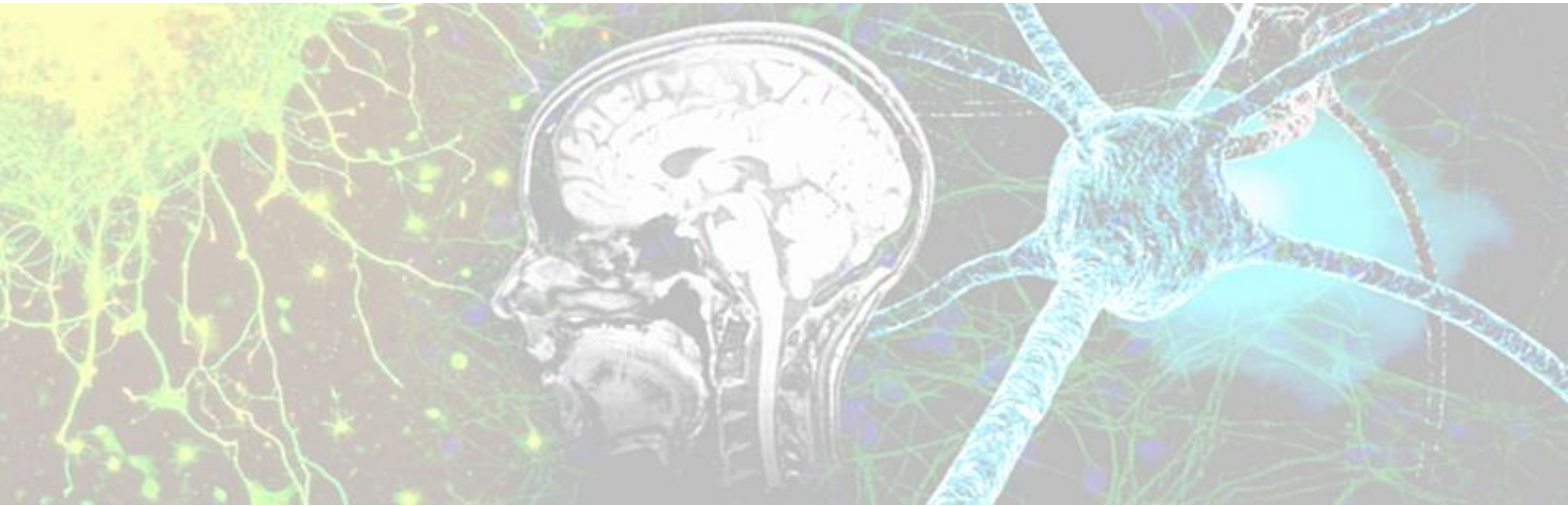
**HAL Id: tel-04352404**

**<https://theses.hal.science/tel-04352404>**

Submitted on 19 Dec 2023

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

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



Université de Lille  
École Doctorale Biologie-Santé de Lille

## Étude du rôle neuronal des isoformes du facteur de risque génétique BIN1 dans la maladie d'Alzheimer

*Thèse de doctorat présentée en vue de l'obtention du grade de docteur en neurosciences*

Soutenue publiquement le 3 Mai 2023 par :

**Erwan LAMBERT**

---

Devant le jury composé de :

Dr Marie-Claude POTIER <sup>1</sup> , PhD - HDR	Rapporteuse
Dr Marie-Laure PARMENTIER <sup>2</sup> , PhD - HDR	Rapporteuse
Dr Magalie LECOURTOIS <sup>3</sup> , PhD - HDR	Examinatrice
Dr David BLUM <sup>4</sup> , PhD - HDR	Examineur et Président du Jury
Dr Pierre DOURLEN <sup>4</sup> , PhD - HDR	Directeur de thèse
Dr Jean-Charles LAMBERT <sup>4</sup> , PhD - HDR	Directeur d'équipe et co-directeur de thèse

<sup>1</sup>Sorbonne Université <sup>2</sup> Université de Montpellier <sup>3</sup> Université de Rouen <sup>4</sup> Université de Lille

---

INSERM-U1167

Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement

Institut Pasteur de Lille

 Université  
de Lille







## Remerciements

En premier lieu, je souhaite remercier le Docteur Marie-Claude POTIER et le Docteur Marie-Laure PARMENTIER d'avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer ce travail.

Mes remerciements s'adressent également au Docteur Magalie LECOURTOIS et au Docteur David BLUM pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je les remercie également d'avoir suivi avec attention mon projet de thèse pendant ces (presque) 4 années et de m'avoir conseillé lors des comités de suivi de thèse.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude au Professeur Philippe AMOUYEL pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire d'abord pour mon stage de Master 2 puis pour ces 4 années de thèse. Merci de m'avoir permis de réaliser ces travaux de thèse dans les meilleures conditions. Soyez assuré de mon plus profond respect.

Je remercie chaleureusement le Docteur Jean-Charles LAMBERT et le Docteur Pierre DOURLIN d'avoir encadré mon travail de thèse. Je vous remercie pour votre patience mais aussi pour vos encouragements. Merci infiniment pour tous vos conseils scientifiques, votre enthousiasme, votre passion et votre soutien. Merci un milliard de fois à Pierre pour tout le temps passé à me conseiller, pour ses explications ultra détaillées et son pédagogisme exceptionnel. Je suis ravi d'avoir fait partie de la Team Fly. J'ai beaucoup appris et grandi grâce à toi. Encore merci pour ta disponibilité et ton immense sympathie.

Un immense merci à tous les membres de l'équipe 3 tant sur l'aspect professionnel que personnel.

Je tiens à remercier mes parents, Nathalie PETILLON et Bruno LAMBERT, ainsi que ma sœur Manon LAMBERT, pour l'amour et le soutien qu'ils m'ont porté et qui m'a permis sereinement d'avancer dans mes études jusqu'à ce jour où je rédige ma thèse pour devenir docteur en neurosciences. Mes pensées vont également à tous les membres de ma famille (parrains, marraines, oncles, tantes et cousins) qui ont toujours cru en moi.

Merci à Hugo et Audrey pour avoir rendu le Master 2 plus qu'agréable.

Merci infiniment à Dolores pour son amitié, son amour et son soutien qui m'ont porté si loin.

Merci à Edouard pour son amitié qui ne faiblit pas depuis quasiment 10 ans.

Merci à toutes celles et ceux avec qui j'ai partagé des moments de vie et qui ont fait de moi la personne que je suis aujourd'hui.





## Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la première maladie neurodégénérative et cause de démence dans le monde. La MA est caractérisée par 2 lésions pathologiques majeures : les plaques séniles, issues de l'agrégation extracellulaire des peptides A $\beta$  et la dégénérescence neurofibrillaire, issues de l'accumulation intracellulaire d'une protéine Tau anormalement hyperphosphorylée, menant à une perte neuronale, induisant un déclin cognitif progressif. Dans ce contexte, un dysfonctionnement et une perte synaptique ainsi qu'un élargissement des endosomes précoces dans les neurones font partie des premiers marqueurs cytopathologiques de la MA. La MA est une pathologie multifactorielle avec une composante génétique estimée à hauteur de 60-80%. Grâce aux études d'association pangénomiques, il a été possible d'identifier de nombreux gènes de susceptibilité pour la MA, dont le gène Bridging Integrator 1 (BIN1), qui est le second facteur de risque génétique en termes d'association, après ApoE. Étant donné le grand nombre d'isoformes que présente BIN1, la compréhension des fonctions spécifiques de BIN1 est complexe. L'objectif de mon travail a été de mieux définir le rôle neuronal de BIN1 et de ses isoformes dans la physiopathologie de la MA. Pour cela, nous avons utilisé la Drosophile, un organisme modèle bien établi et notamment le modèle du neurone photorécepteur (PR) de l'œil de Drosophile adulte. Nous avons montré que la surexpression de l'isoforme 1 de BIN1 humaine (BIN1iso1) induit spécifiquement une dégénérescence neuronale, contrairement à la surexpression de l'isoforme 8 (BIN1iso8) et de l'isoforme 9 (BIN1iso9). La spécificité de BIN1iso1 vient de son domaine CLAP, impliqué dans l'endocytose et le trafic intracellulaire. Par ailleurs, la dégénérescence induite par BIN1iso1 était caractérisée par une accumulation de vésicules anormalement élargies, présentant des marqueurs endosomaux précoces et tardifs, suggérant qu'un blocage au niveau des endosomes précoces et/ou tardifs pouvait être la cause de la dégénérescence. Pour répondre à cette hypothèse, nous avons réalisé un criblage de facteurs impliqués dans le trafic intracellulaire. Nous avons montré que des régulateurs des endosomes précoces et de recyclage, Rab5 et Rab11, préviennent la neurodégénérescence induite par BIN1iso1, indiquant qu'un défaut au niveau des endosomes est bien responsable de la dégénérescence neuronale. Le trafic endosomal est crucial dans la fonction synaptique des neurones, qui est affectée précocement dans la MA. Nous avons donc aussi voulu décrypter le rôle de BIN1 humaine et de ses isoformes au niveau de la synapse. Nous avons ainsi identifié un défaut de la transmission synaptique dans les neurones PRs. Nous avons ensuite utilisé la jonction neuromusculaire (JNM), le modèle synaptique de référence chez la Drosophile et nous avons observé que la surexpression de BIN1iso1, contrairement à BIN1iso8 et 9, induit une altération de la morphologie des boutons synaptiques, arborant un aspect déchiqueté et se regroupant en grappes. L'analyse morphométrique des JNMs nous a permis de mettre en évidence que la surexpression de BIN1iso1 augmente significativement le nombre de boutons synaptiques et diminue leur taille moyenne, sans impacter le nombre de zones actives, probablement via les mêmes mécanismes décrits dans les neurones PRs. L'ensemble des résultats obtenus chez la Drosophile ont été étendus en modèles de culture cellulaire mammifère. En conclusion, nos données fournissent de nouvelles informations sur le rôle physiopathologique du gène de susceptibilité de la MA, BIN1 et de ses isoformes. Plus précisément, nos résultats démontrent que BIN1iso1 contribue aux dysfonctionnements endosomaux précoces et aux changements morphologiques des synapses, deux caractéristiques pathologiques précoces de la MA. Ces résultats ont des implications importantes pour la compréhension des mécanismes complexes qui sous-tendent la MA.

## **Abstract**

Alzheimer's disease (AD) is the leading neurodegenerative disease and cause of dementia in the world. AD is characterized by 2 main pathological lesions: senile plaques, resulting from the extracellular aggregation of A $\beta$  peptides, and neurofibrillary tangles resulting from intracellular accumulation of hyperphosphorylated Tau protein, leading to neuronal loss and progressive cognitive decline. In this context, dysfunction and synaptic loss, as well as enlargement of early endosomes in neurons, are among the first cytopathological markers of AD. AD is a multifactorial pathology with a genetic component estimated at 60-80%. Through genome-wide association studies, it has been possible to identify numerous susceptibility genes for AD, including the Bridging Integrator 1 (BIN1) gene, which is the second genetic risk factor in terms of association, after ApoE. Given the large number of isoforms presented by BIN1, understanding the specific functions of BIN1 is complex. The objective of my work has been to better define the neuronal role of BIN1 and its isoforms in the pathophysiology of AD. For this, we used the *Drosophila* (fruit fly), a well-established model organism, and in particular the photoreceptor (PR) neuron model of the adult *Drosophila* eye. We showed that overexpression of human BIN1 isoform 1 (BIN1iso1) specifically induces neuronal degeneration, unlike overexpression of isoform 8 (BIN1iso8) and isoform 9 (BIN1iso9). The specificity of BIN1iso1 comes from its CLAP domain, involved in endocytosis and intracellular trafficking. Moreover, the degeneration induced by BIN1iso1 was characterized by an accumulation of abnormally enlarged vesicles, presenting early and late endosomal markers, suggesting that a blockage at the early and/or late endosomes level could be the cause of degeneration. To address this hypothesis, we screened for factors involved in intracellular trafficking. We showed that regulators of early and recycling endosomes, Rab5 and Rab11, prevent the neurodegeneration induced by BIN1iso1, indicating that an endosome defect is indeed responsible for neuronal degeneration. Endosomal trafficking is crucial in the synaptic function of neurons, which is early affected in AD. Therefore, we also wanted to decipher the role of human BIN1 and its isoforms at the synapse level. We first identified a defect in synaptic transmission in PR neurons. We then used the neuromuscular junction (NMJ), the reference synaptic model in *Drosophila*, and we observed that overexpression of BIN1iso1, unlike BIN1iso8 and 9, induces an alteration of the morphology of synaptic boutons, displaying a shredded appearance and clustering together. Morphometric analysis of the NMJs allowed us to highlight that overexpression of BIN1iso1 significantly increases the number of synaptic boutons and decreases their average size, without impacting the number of active zones, probably through the same mechanisms described in PR neurons. All the results obtained in *Drosophila* were extended in mammalian cell culture models. In conclusion, our data provide new information on the pathophysiological role of the AD susceptibility gene, BIN1, and its isoforms. Specifically, our results demonstrate that BIN1iso1 contributes to early endosomal dysfunction and morphological changes of synapses, two early pathological characteristics of AD. These results have important implications for understanding the complex mechanisms underlying AD.

## **Résumé vulgarisé pour le grand public (Français / Anglais)**

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative qui affecte la mémoire et le langage. Le gène BIN1 est un important gène de susceptibilité pour la MA. Toutefois, ses rôles dans les neurones restent méconnus. Pour comprendre le rôle neuronal des différentes formes de la protéine issue de BIN1, nous avons utilisé la Drosophile (mouche du vinaigre). Nous avons observé que l'une des formes de BIN1, appelées BIN1iso1, provoque la dégénérescence des neurones, associée à des altérations au niveau de structures appelées endosomes précoces. Ces structures sont importantes pour le fonctionnement des neurones et leur dysfonctionnement est un des premiers signes de la MA. Nous avons aussi constaté que BIN1iso1 provoque une toxicité au niveau des synapses, les connexions entre les neurones, essentielles au fonctionnement du système nerveux. En conclusion, ces travaux permettent de mieux comprendre le rôle du facteur de risque génétique BIN1 dans la MA.

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease that affects memory and language. The BIN1 gene is an important susceptibility gene for AD. However, its roles in neurons remain unknown. To understand the neuronal role of the different forms of the BIN1 protein, we used *Drosophila* (fruit fly). We observed that one of the forms of BIN1, called BIN1iso1, causes degeneration of neurons, associated with alterations in structures called early endosomes. These structures are important for neuron function and their dysfunction is one of the first signs of AD. We also found that BIN1iso1 causes toxicity at the level of synapses, the connections between neurons that are essential for the functioning of the nervous system. In conclusion, this work provides insight into the role of the genetic risk factor BIN1 in AD.



## Publications et Communications

Ce travail de thèse a donné lieu à la publication suivante :

**Lambert E**, Saha O, Soares Landeira B, Melo de Farias AR, Hermant X, Carrier A, Pelletier A, Gadaut J, Davoine L, Dupont C, Amouyel P, Bonnefond A, Lafont F, Abdelfettah F, Verstreken P, Chapuis J, Barois N, Delahaye F, Dermaut B, Lambert JC, Costa MR, Dourlen P (2022) The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects. *Acta Neuropathol Commun* 10. doi: 10.1186/s40478-021-01285-5

Ainsi qu'aux communications suivantes:

*AD/PD 2022 - The 16th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases*  
Poster: "Isoform-Dependent Neurotoxicity of the Alzheimer's Disease Risk Factor BIN1 in Drosophila"  
- Barcelona - 15/03/2022-20/03/2022

*Journée André Verbert 2021 - Colloque des doctorants*  
Prize for the Best Communication for the presentation: "Isoform-Dependent Neurotoxicity of the Alzheimer's Disease Risk Factor BIN1 in Drosophila" - Lille - 15/09/2021

*21st annual meeting of the French Club for Invertebrate Neurobiology*  
Datablitz: "Isoform-Dependent Neurotoxicity of the Alzheimer's Disease Risk Factor BIN1 in Drosophila" - Hybrid conference - 14/06/2021-16/06/2021

*AD/PD 2021 - The 15th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases -*  
Poster: "Isoform-Dependent Neurotoxicity of the Alzheimer's Disease Risk Factor BIN1 in Drosophila"  
- Virtual Conference - 09/03/2021-14/03/2021

*Longevity – 3rd international symposium research on healthy aging*  
Flashtalk: "Characterization of the neurotoxicity of the Alzheimer's disease risk factor BIN1 in Drosophila" - Lille - 11/12/2019

*33rd annual French Drosophila conference*  
Poster: "Isoform-Dependent Neurotoxicity of the Alzheimer's Disease Risk Factor BIN1 in Drosophila"  
- Lyon - 06/11/2019-09/11/2019

*Journée André Verbert 2019 - Colloque des doctorants*  
Annual symposium for PhD students, intended for the presentation of their research works in order to promote exchanges between students from different disciplines - Lille - 10/09/2019

*LiCEND Summer School 2019: Experimental Models for Neurodegenerative Diseases: From Cells to Model Organisms*  
The objectives of the LiCEND Summer School are to present a large selection of experimental models and technological applications dedicated to the investigation of neurodegenerative diseases - Lille - 02/07/2019-05/07/2019



## Sommaire

Remerciements .....	3
Résumé .....	5
Abstract.....	6
Résumé vulgarisé pour le grand public (Français / Anglais).....	7
Publications et Communications .....	9
Abbréviations .....	15
Introduction .....	19
1- La maladie d'Alzheimer .....	21
1. Origine et enjeux .....	21
i. Définition et historique .....	21
ii. Symptômes et évolution .....	22
iii. Société et impact de la MA.....	23
iv. Diagnostic et prise en charge .....	24
2. Caractéristiques physiopathologiques.....	26
i. Amyloidopathie et Plaques amyloïdes .....	26
ii. Tauopathie et Dégénérescence neurofibrillaire.....	29
iii. Interactions Tau-A $\beta$ .....	31
3. Génétique de la MA.....	32
i. Formes monogéniques autosomiques dominantes précoces.....	32
ii. Formes sporadiques tardives .....	32
4. Identification des facteurs de risque de la MA et études fonctionnelles de ces gènes.....	33
i. APOE : 1er facteur identifié .....	33
ii. Etudes d'analyses pangénomiques (GWAS) .....	34
iii. Etudes fonctionnelles des gènes associés à la MA .....	35
5. Hypothèses expliquant la pathogenèse de la MA .....	36
i. Hypothèse de la cascade amyloïde.....	36
ii. Défauts synaptiques .....	38
iii. Défauts du trafic intracellulaire .....	39
2- Le gène BIN1.....	42
1. Structure du gène BIN1 .....	42
2. Organisation de la protéine BIN1 .....	43
i. Organisation des différents domaines protéiques de BIN1 .....	43
ii. Régulation de la protéine BIN1.....	44
3. Expression et localisation de BIN1 en contexte physiologique .....	44
4. Rôles cellulaires de BIN1 .....	45
i. Processus membranaires.....	45



ii.	Trafic intracellulaire .....	45
iii.	Régulation du cytosquelette .....	47
5.	Maladies associées à BIN1 .....	47
i.	BIN1 et pathologies musculaires.....	47
ii.	BIN1 et cancer .....	48
6.	Implication de BIN1 dans la pathologie d'Alzheimer .....	49
i.	Modification de l'expression et de la localisation de BIN1 dans la MA .....	49
ii.	Variants de BIN1 associés à la MA .....	50
iii.	BIN1 et amyloidopathie .....	51
iv.	BIN1 et Tauopathie.....	51
3-	Drosophila Melanogaster.....	53
1.	Principes généraux de l'organisme modèle de la Drosophile .....	53
2.	Modèle du neurone photorécepteur externe .....	55
3.	Modèle de la jonction neuromusculaire .....	56
4.	Conservation fonctionnelle des isoformes humaines de BIN1 chez la Drosophile .....	56
4-	Objectifs de la thèse .....	57
	Matériels Et Méthodes.....	59
1-	Lignées des Drosophiles transgéniques et condition d'élevage .....	61
2-	Western Blot des échantillons de Drosophiles .....	62
3-	Neutralisation de la cornée.....	62
4-	Dissection des rétines des yeux de Drosophiles adultes .....	63
5-	Immunofluorescence des rétines des yeux de Drosophiles adultes .....	63
6-	Microscopie électronique.....	64
7-	Co-immunoprécipitation.....	64
8-	Électrophysiologie .....	64
9-	Dissection des JNM de larves de 3 <sup>ème</sup> stade de Drosophile .....	64
10-	Immunofluorescence des JNM de larves de 3 <sup>ème</sup> stade de Drosophile.....	65
11-	Quantification des paramètres morphologiques des larves de Drosophiles .....	65
12-	Analyses statistiques .....	66
	Résultats.....	68
1-	L'isoforme 1 humaine de BIN1 est neurotoxique pour les neurones photorécepteurs chez la Drosophile.....	70
1.	BIN1iso1 induit spécifiquement la dégénérescence des neurones photorécepteurs .....	70
2.	La dégénérescence induite par BIN1 est partiellement dépendante de la lumière.....	71
3.	La toxicité induite par BIN1 est dépendante du domaine CLAP .....	71
2-	BIN1iso1 induit une accumulation de vésicules dans les neurones photorécepteurs .....	73
1.	BIN1iso1 induit des anomalies morphologiques dans le corps cellulaire des neurones photorécepteurs.....	73
2.	Évaluation de la nature des vésicules induites par BIN1iso1.....	74

3- L'expression de régulateurs de la voie endosome-lysosome permet de moduler la toxicité induite par BIN1iso1 .....	74
1. Criblage de régulateurs pouvant moduler la dégénérescence induite par BIN1.....	76
i. Modulation de régulateurs de la cascade de phototransduction.....	76
ii. Modulation de régulateurs de l'endocytose.....	77
iii. Modulation de régulateurs du métabolisme du PIP2.....	80
iv. Modulation de régulateurs des endosomes .....	81
v. Modulation de régulateurs du retromère et du lysosome.....	84
vi. Recherche de l'implication d'autres facteurs de risque de la MA dans les altérations de la voie endolysosomale induites par BIN1iso1.....	85
vii. Effet de la modulation de l'APP sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.....	86
2. Recherche de partenaire(s) d'interaction de BIN1 .....	87
4- L'expression de BIN1iso1 engendre une altération de la transmission synaptique dans les neurones PRs.....	90
1. BIN1iso1 induit des anomalies morphologiques dans les terminaisons synaptiques des neurones photorécepteurs.....	90
2. Altération de l'activité électrophysiologiques dans les neurones photorécepteurs .....	91
5- L'isoforme 1 de BIN1 induit une altération des JNM dépendante de la voie endosomale.....	92
1. Phénotype et paramètres morphométriques .....	93
2. Rétablissement du phénotype initial par l'expression de Rab11.....	95
Discussion .....	99
1- BIN1 et défauts endosomaux .....	101
2- BIN1 et synapse .....	106
Perspectives .....	112
1- BIN1 et endosomes .....	114
2- BIN1 et synapse .....	115
Bibliographie .....	117
Annexes.....	158
1- Annexe 1 : Tableau référençant les lignées de Drosophiles transgéniques utilisées dans ces travaux de thèse .....	160
2- Annexe 2 : Publication "The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects" .....	183



## Abbréviations

ABCA7	ATP Binding Cassette subfamily A member 7
Ach	Acétylcholine
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AICD	Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain
AMPA	$\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
AMPH1	Amphiphysin 1
AP1/AP2	Adaptator Protein 1/2
APOE	Apolipoprotéine E
APP	Amyloide Precursor Protein
Appl	APP like
ARNi	ARN interférent
ARNm	Acide RiboNucléique
ATPase	Adénosine TriPhosphate
A $\beta$	Amyloide $\beta$
BACE1	$\beta$ -site APP Cleaving Enzyme-1
BAR	Bin, Amphiphysin and Rvs
BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BIN1	Bridging Integrator 1
BIN1isoX	Isoforme X de BIN1
Brp	Bruch Pilot
CA	Constitutivement Active
CAMK2A	Calcium/Calmodulin Dependent Protein Kinase II Alpha
Cav1.2	Alpha 1C subunit L type voltage-dependent calcium channel
Cav3	Cavéoline 3
CD2AP	CD2 Associated Protein
CD33	Cluster of differentiation 33
CDK5	Cyclin-Dependent Kinase 5
CELF1	CUGBP Elav-Like Family Member 1
CHO	Chinese Hamster Ovarian
CLAP	Clathrin and Adaptator Protein
CLIP170	Cytoplasmic Linker Protein 170
CLU	Clusterin
CMV	Corps MultiVésiculaires
CR1	Complement C3b/C4b Receptor 1
CREB	C-AMP Response Element-Binding protein
Cs10	Canton-Special 10
CTF $\alpha/\beta$	C-Terminal Fragment $\alpha/\beta$
dAmph	drosophila Amphiphysine
Dlg	Disc Large
DLT	Dépolarisation à Long Terme
DM	Dystrophie Myotonique
DN	Dominant-Négatif
DNF	Dégénérescence NeuroFibrillaire
Drp1	Dynamin-related protein 1
EEA1	Early Endosome Antigen 1
EHD1	EPS15 Homology Domain-containing protein 1
EMA	European Medicines Agency

EMC	Endocytose Médiée par la Clathrine
EOAD	Early Onset Alzheimer's Disease
EPHAX	Ephrin type-A Receptor x
ERG	ElectroRétinoGramme
ERK1	Extracellular signal-Regulated Kinases
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EYFP	Enhanced Yellow Fluorescent Protein
FAD	Familial Alzheimer's Disease
FDA	Food Drug Administration
FERMT2	Fermitin family homolog 2
FYVE	Fab 1 (yeast orthologue of PIKfyve), YOTB, Vac 1 (vesicle transport protein), and EEA1
GABA	Gamma-AminoButyric Acid
GDNF	Glial derived Neurotrophic Factor
GFP	Green Fluorescent Protein
GFR $\alpha$ 1	GDNF family receptor $\alpha$ 1
GluA2	AMPA-selective glutamate receptor 2
GSK3 $\beta$	Glycogen synthase kinase-3 $\beta$
GWAS	Genome Wide Association Study
HEK	Human Embryonic Kidney
HeLa	cell line derived from cervical cancer cells taken from <b>Henrietta Lacks</b>
HRP	Horseradish Peroxidase
IgG	Immunoglobuline G
InDel	Insertion
IPSC	Induced Pluripotent Stem Cell
IQR	InterQuartile Range
IRM	Imagerie par résonance magnétique
JNM	Jonction NeuroMusculaire
KD	Knock Down
KLF4	Kruppel-like factor 4
KO	Knock Out
LCS	Liquide cérébrospinal
LDL	Low Density Lipoprotein
LOAD	Late Onset Alzheimer's disease
MA	Maladie d'Alzheimer
mAChR	Muscarinic Acetylcholine Receptor
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MAPT	Microtubule-Associated Protein Tau
MBD	Myc Binding Domain
MCI	Mild Cognitive Impairment
MCN	Myotonie CentroNucléaire
MEF2	Myocyte Enhancer Factor-2
MMSE	Mini-Mental State Examination
Mon1	Monensin sensitivity 1
Nhis	Neurones humains induits
NMDA	N-Méthyl-D-Aspartic acid
N-WASP	Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein
PACIN3	Protein kinase C And Casein kinase Substrate In Neurons protein 3
PAST1	Putative Achaete Scute Target 1
PICALM	Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein
PICK1	Protein Interacting with C Kinase 1

PIPxK	Phosphatidylinositol 5-phosphate x-kinase
PLAC-seq	Proximity Ligation-Assisted CHIP-Sequencing
PLC	PhosphoLipase C
PLT	Potentialisation à Long Terme
PR	PhotoRécepteurs
PRD	Prolin Rich Domain
PrPsc	scrapie isoform of the prion protein
PSEN1/2	Présiniline 1/2
PTK2B	Protein Tyrosine Kinase 2 Beta
RIN3	Ras And Rab Interactor 3
ROI	Region Of Interest
SAD	Sporadic Alzheimer's disease
sAPP $\alpha/\beta$	Soluble APP $\alpha/\beta$
SD	Syndrome de Down
SH3	Src Homology 3
sktl	skittle
SNC	Système Nerveux Central
SNP	Système Nerveux Périphérique
SORL1	Sortilin Related Receptor 1
SP1	Specificity Protein 1
synj	Synaptojanine
TEP	Tomographie par émission de positrons
TREM2	Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cells 2
TrkB	Tropomyosin receptor kinase B
TRP	Transient Receptor Potential
TS	ThermoSensible
UAS	Upstream Activating Sequence
VAMP2	Vesicle Associated Membrane Protein 2
VhA68-2	Vacuolar H[+] ATPase 68 kDa subunit 2
VhaAC39-1	Vacuolar H[+] ATPase AC39 subunit 1
Vps	Vacuolar Protein Sorting
WES	Whole Exome Sequencing
YFP	Yellow Fluorescent Protein
Yp3	Yolk Protein 3



# Introduction



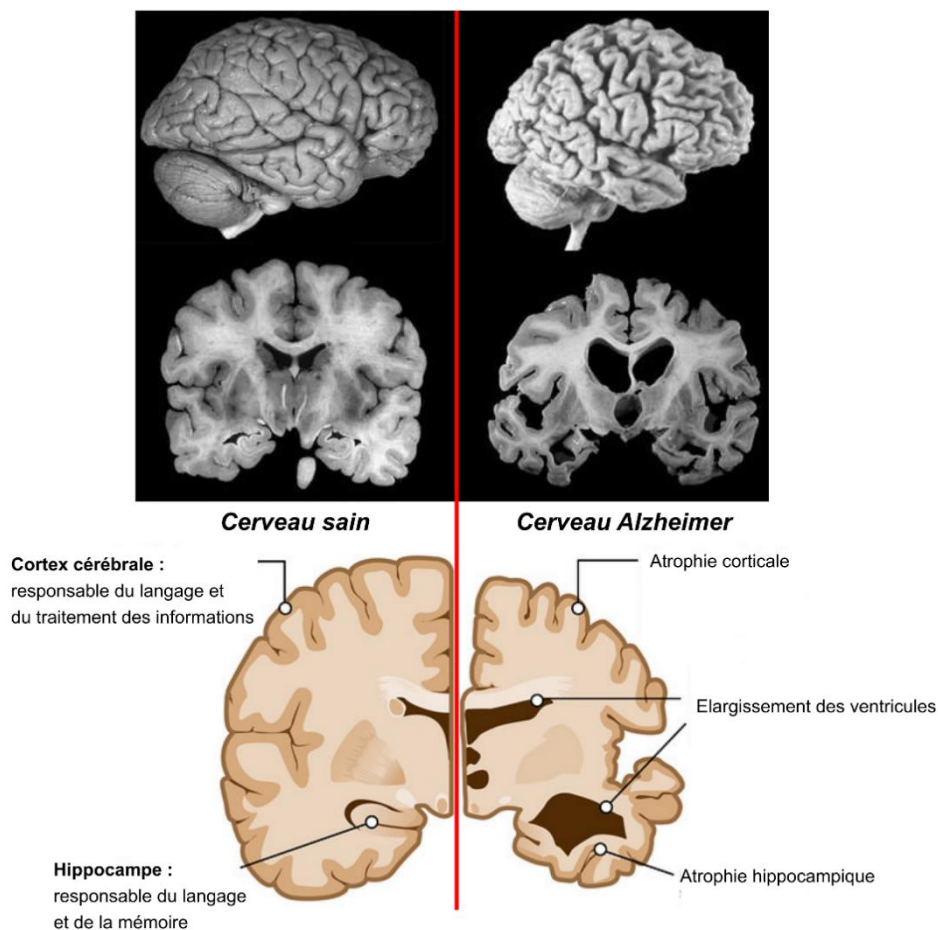


# 1- La maladie d'Alzheimer

## 1. Origine et enjeux

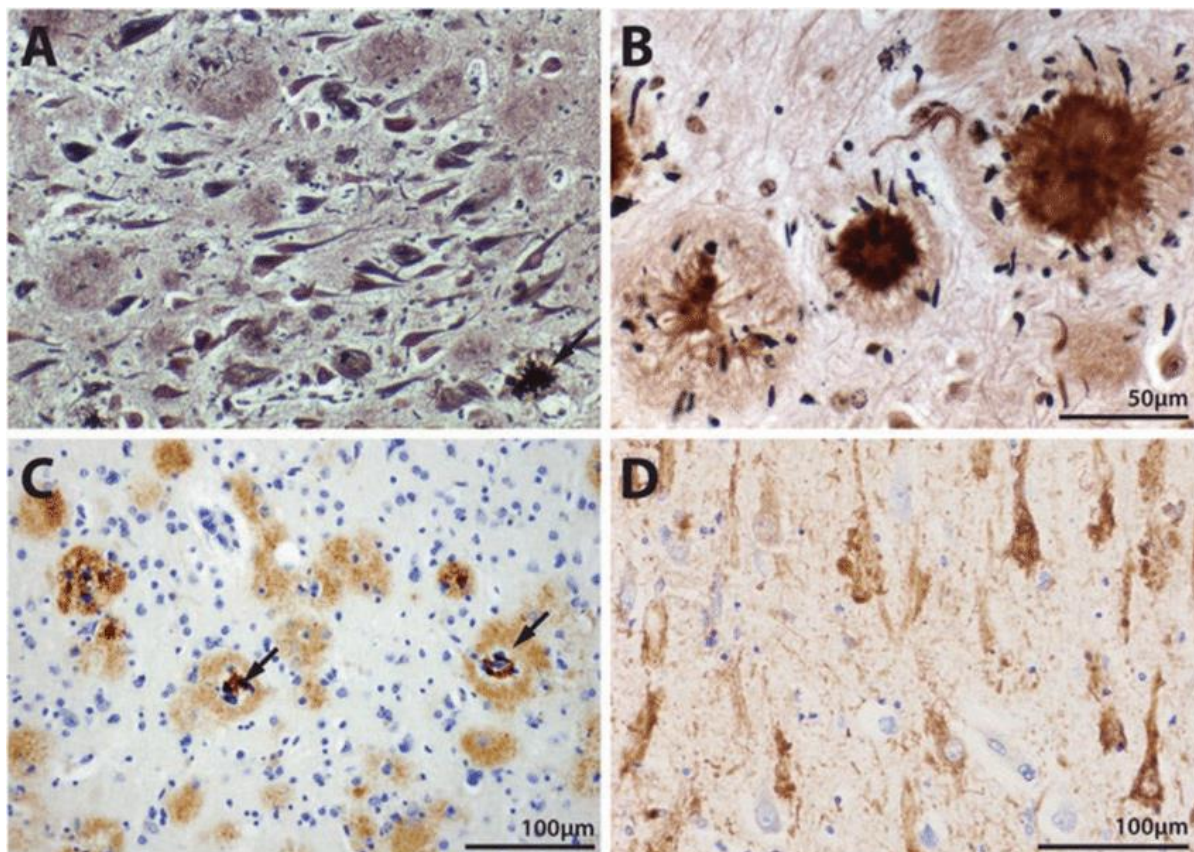
### i. Définition et historique

En 1901, au "Frankfurt Asylum", Alois Alzheimer, un psychiatre et neuropathologiste allemand, débute le traitement d'une patiente âgée de 51 ans se prénommant Auguste Deter. Cette dame souffrait à ce moment de démence associée à une perte de mémoire progressive ainsi que d'aphasie, de pertes d'orientation spatio-temporelle ou encore d'hallucinations. Malgré les soins et attentions portés à la patiente, sa condition s'aggrava petit à petit et 5 ans après sa prise en charge, soit en 1906, Auguste Deter finira par s'éteindre. Intrigué par ce cas, le Dr Alzheimer réalisa une autopsie du cerveau de sa défunte patiente. Il observa une atrophie du cortex cérébral ainsi qu'un élargissement des ventricules (Figure 1) et identifia des changements histopathologiques qui seront connus plus tard comme les caractéristiques neuropathologiques de cette affection dégénérative, la dégénérescence neurofibrillaire et les plaques séniles.



**Figure 1 : Atrophie cérébrale survenant dans la maladie d'Alzheimer.** Au cours de la maladie, le cerveau subit une diminution du volume du cortex ainsi qu'un élargissement des ventricules et un rétrécissement de l'hippocampe. (Source : Alzheimer's association ; [503])

C'est ainsi qu'en 1907, le Dr Alzheimer publia le premier cas de la maladie désormais éponyme [5]. Il aura ensuite fallu patienter jusqu'à dans les années 80 pour que ces 2 lésions soient décortiquées. Nous savons aujourd'hui qu'il s'agit de la dégénérescence neurofibrillaire, qui est caractérisée par l'accumulation intracellulaire de la protéine Tau hyper- et anormalement phosphorylée (Figure 2AD) et des plaques séniles, qui sont caractérisées par l'agrégation extracellulaire des peptides amyloïdes  $\beta$  ( $A\beta$ ) (Figure 2BC). Ainsi, tous ces changements pathologiques vont conduire à une perte neuronale aboutissant à un déclin cognitif progressif.



**Figure 2 : Caractéristiques cytopathologiques de la maladie d'Alzheimer.** Coloration à l'argent du tissu cérébral cortical (A) montrant des plaques et des enchevêtrements neurofibrillaires dans le cortex et agrandissement de plaques neuritiques positives à l'argent (B). Protéine amyloïde  $\beta$  dans les plaques (C) et tau hyperphosphorylée dans les enchevêtrements neurofibrillaires (D). La barre d'échelle en C est équivalente à celle en A. Les flèches indiquent les plaques neuritiques. (Source : [257])

## ii. Symptômes et évolution

La maladie d'Alzheimer (MA) se définit par le caractère évolutif des dommages neuronaux et de ce fait, par l'apparition et l'aggravation progressive des symptômes. En fonction de l'apparition de ces derniers, de leur importance et de leur impact sur le bien-être quotidien, il est possible de distinguer différents stades de la maladie (Figure 3).

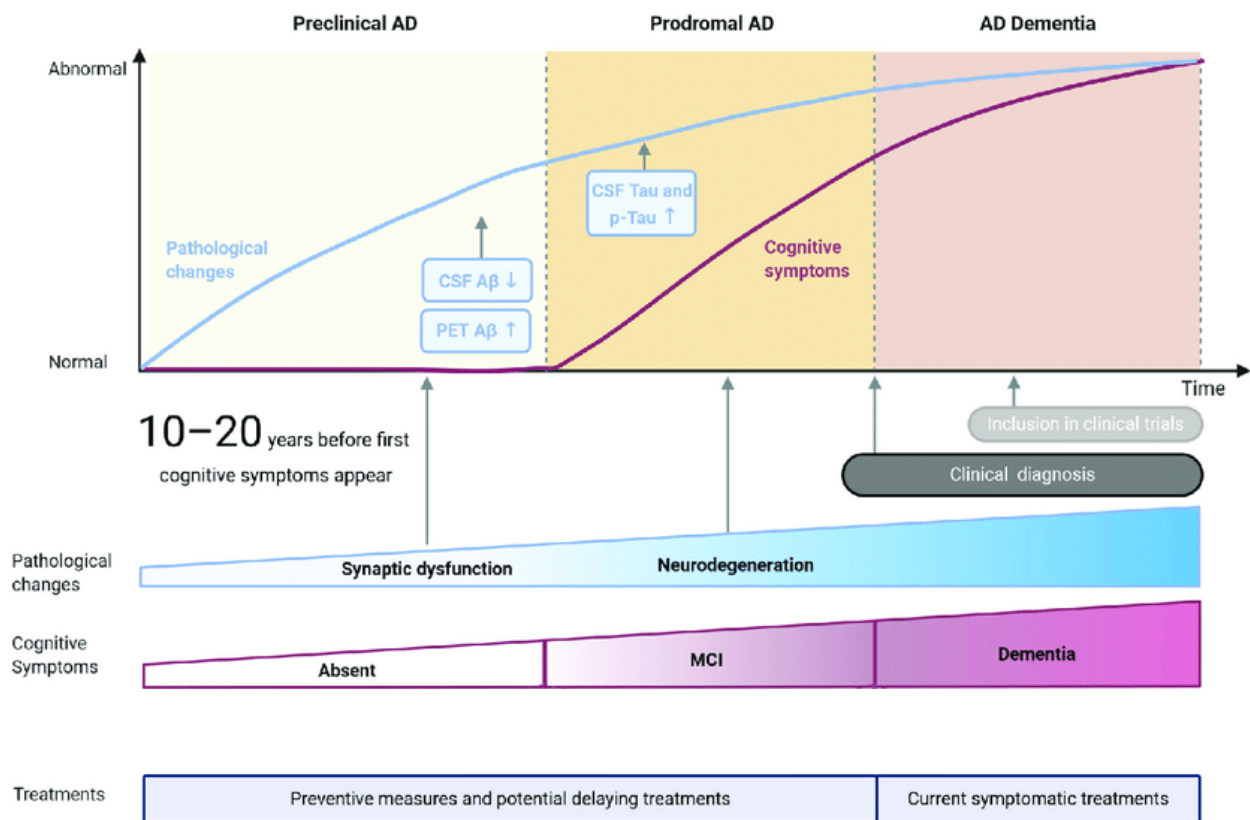
Le stade asymptomatique ou préclinique est le stade où aucun symptôme cognitif n'est détectable (Figure 3), bien que des changements pathologiques commencent déjà à survenir dans le cerveau des années avant l'apparition des symptômes avant notamment l'augmentation de la charge amyloïde et Tau dans le liquide cébrospinal (LCS).

Le stade suivant est appelé prodromal ou prédéméntiel (Figure 3). C'est à ce moment que les premiers symptômes font leur apparition. Il s'agit ici de troubles neurocognitifs mineurs (MCI, Mild Cognitive Impairment). Un déficit de la mémoire épisodique se déclenche alors : les oublis mineurs commenceront à se multiplier comme par exemple l'oubli d'un rendez-vous. A ce stade, le patient est conscient de ces désagréments mais reste parfaitement autonome même si cela peut représenter quelques efforts supplémentaires qu'à l'accoutumé.

Le stade de démence est finalement atteint lorsque le patient voit ses troubles cognitifs et comportementaux impacter considérablement son autonomie et de ce fait la vie quotidienne du patient et de sa famille par extension (Figure 3). Dans ce stade, caractérisé par des troubles neurocognitifs majeurs, il est possible de distinguer 3 phases. Lors de la phase de démence légère, les troubles de la mémoire s'intensifient et la démence s'installe. Avec elle, des troubles se renforcent et des nouveaux apparaissent comme l'aphasie (troubles du langage), la dysorthographe (troubles de l'écriture), l'apraxie (troubles du mouvement), l'agnosie (troubles de

la reconnaissance des objets et des personnes) et l'apathie (retrait des activités habituelles). A l'ensemble de ces troubles s'additionnent une altération des fonctions exécutives (raisonnement, organisation et planification), la perte de l'orientation temporo-spatiale et une détérioration du comportement et de l'humeur (anxiété, dépression, irritabilité). Par-dessus tout, les patients exhibent une anosognosie (le fait de ne pas être conscient de l'ensemble de ses déficits) qui représente en lui-même un critère de diagnostic. Surviennent ensuite les phases modérées et sévères, où les symptômes et troubles s'aggravent de plus en plus, nécessitant une aide clinique, jusqu'à ce que le patient perde totalement son autonomie et ne puisse plus réaliser aucun geste quotidien sans assistance. Le patient succombera finalement de complications médicales telles que des infections ou des atteintes pulmonaires.

Il faut toutefois garder en tête que malgré l'existence de ces différents stades, la maladie est un continuum et son évolution ne suit pas des définitions rigoureusement précises.



**Figure 3 : Principaux stades et caractéristiques de la maladie d'Alzheimer.** Les changements pathologiques et les symptômes cognitifs sont représentés par des lignes bleues et mauves, respectivement. Les caractéristiques pathologiques actuellement utilisées comme biomarqueurs (Aβ et tau) sont représentées par des rectangles bleus, tandis que les principaux changements pathologiques globaux sont indiqués par des flèches. Les symptômes cognitifs sont résumés en stades MCI (Mild Cognitive Impairment) et démence. (Source : [419])

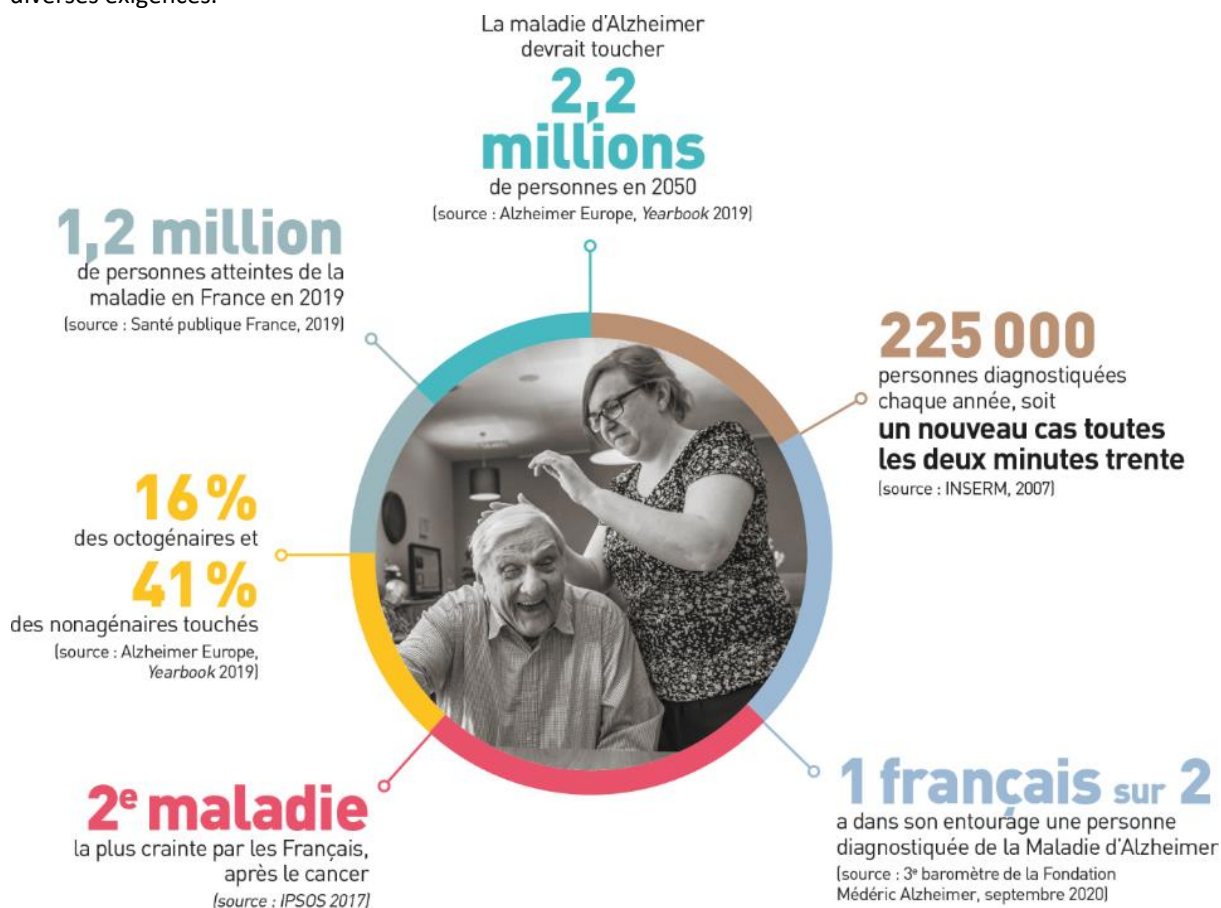
### iii. Société et impact de la MA

La MA est aujourd'hui la 1<sup>ère</sup> maladie neurodégénérative dans le monde et la forme de démence la plus courante. Parmi l'ensemble des démences existantes comme les démences à corps de Lewy ou les démences fronto-temporales, la MA est la plus prévalente avec 70% des cas [6, 7]. Elle affecte dans une grande majorité les personnes âgées (>60 ans) bien que 10% des patients sont atteints de formes monogéniques précoces [6, 7]. La prévalence de la maladie augmente notamment avec l'âge [6, 7]. De nos jours, 1-1,2 millions de personnes sont touchées par la MA en France et cela ne sera pas moins de 1,8-2 millions en 2040 d'après les estimations [6, 7]. Dans le monde, environ 50 millions de personnes sont atteintes et le chiffre atteindrait 140 millions à l'horizon 2050 (Figure 4). A noter, en outre, que les femmes sont plus affectées que les hommes, à hauteur de 10 hommes pour 15 femmes [6, 7].



La prévalence de la MA induit inévitablement divers enjeux sociétaux tels que des enjeux éthiques et économiques. Effectivement, il est nécessaire de s'assurer que, quelle que soit l'importance des troubles, les patients soient respectés, dans leur humanité et leur dignité, en tant qu'individus sensibles. Sont concernés, de même, les aidants et les services de santé qui ont besoin de voir leurs ressources et leur efficacité s'accroître pour permettre une prise en charge optimale. D'un autre côté, l'aspect économique n'est pas à négliger puisque les conséquences sociales et médicales ont un coût considérable pour les différentes familles et les états, à hauteur de 32 milliards d'euros par an, seulement pour la France.

Tout cela demande, tout d'abord, un diagnostic performant et des traitements efficaces afin de répondre à ces diverses exigences.



**Figure 4 : Chiffres clés de la maladie d'Alzheimer.** La MA est la 1<sup>ère</sup> cause de démence : 60 à 70 % des cas (OMS 2021). 14,1 millions de cas de démence se trouvent en Europe (OMS 2021), soit près de 25 %. Le nombre de nouveaux cas annuels de démences dans le monde serait proche de 10 millions (OMS 2021). Un rapport de l'Alzheimer Disease International de 2021 précise que toutes les 3 secondes, quelqu'un dans le monde développe une démence. Selon la même source, 75 % des cas de démence sont potentiellement non diagnostiqués, représentant 41 millions de personnes. (Source : Fondation Médéric Alzheimer ; Fondation pour la Recherche Médicale)

#### iv. Diagnostic et prise en charge

Bien que la maladie ait été découverte il y a plus de 100 ans et que la recherche ait grandement progressé à son sujet, le diagnostic reste relativement tardif et les traitements restent, à l'heure actuelle, non curatifs mais seulement symptomatiques.

Le diagnostic tardif de la MA est principalement dû à l'apparition tardive des symptômes, qui alertent sur la possibilité de souffrir d'un certain type de démence. De plus, le caractère invasif et le coût élevé des techniques de diagnostic disponibles ne permettent pas leur utilisation en routine et ne sont utilisées pour le diagnostic que lorsque les symptômes sont déjà présents. Dès que les premiers symptômes apparaissent sous forme de petites pertes de mémoires anodines, de désorientation spatio-temporelle ou encore de problèmes d'élocution, le

médecin réalise un examen clinique ainsi qu'un ensemble de tests neuropsychologiques à l'instar du MMSE (Mini-Mental State Examination), du test de Lawton (évaluant partiellement le degré d'autonomie) ou du test de Grober et Buschke (évaluant la mémoire verbale et la mémoire à court terme) qui permettent d'identifier les différentes formes de démences. En dépit des tests actuellement disponibles, le diagnostic de la MA demeure complexe en raison de la similarité des symptômes entre différents types de démences, ainsi que de la possibilité de développer une démence mixte impliquant deux types de démences différentes simultanément.

Malgré le fait que les avancées technologiques récentes aient permis d'améliorer le diagnostic grâce à diverses techniques d'imagerie cérébrale, leur utilisation ne soit pas encore généralisée en raison de leur coût élevé. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) permet, par exemple, de détecter l'atrophie corticale et hippocampique, tandis que la tomographie par émission de positrons (TEP) permet de visualiser une diminution pathologique de l'activité des neurones dans certaines régions du cerveau, ainsi que de détecter les plaques amyloïdes et/ou des agrégats de Tau grâce à des biotraceurs spécifiques. Les niveaux d'Aβ et Tau peuvent également être détectés dans le LCS des patients par ponction lombaire pour servir de biomarqueurs, mais cette technique n'est pas non plus utilisée en routine à cause de son caractère invasif. Cependant, ces marqueurs peuvent également être impliqués dans d'autres affections amyloïdes et tauopathies. Une combinaison de plusieurs examens est généralement nécessaire pour un diagnostic plus précis chez les patients atteints de MA [40, 108, 480]. Malgré tout, le diagnostic final et certain de la MA repose, à l'heure actuelle, sur l'analyse post-mortem du cerveau des patients.

Par conséquent, il est impératif de combiner toutes les données disponibles, y compris celles issues de l'imagerie cérébrale, des tests neuropsychologiques et des analyses biologiques, afin de poser un diagnostic précis et d'initier une prise en charge précoce pour optimiser le parcours de santé. À cette fin, une approche multidimensionnelle est recommandée, impliquant une combinaison d'approches médicamenteuses, psychologiques et sociales. Il est à noter, par ailleurs, qu'il est impératif de développer des biomarqueurs détectables précocement, comme par exemple via un test sanguin, ce qui permettra une détection avancée peu onéreuse et non invasive.

Concernant l'approche médicamenteuse, il n'existe, à ce jour, aucun traitement curatif pour la MA. Toutefois, il existe des traitements symptomatiques qui peuvent ralentir l'évolution de la maladie. Il existe, à l'heure actuelle, 4 médicaments disponibles sur le marché. Le Donépézil (Aricept®), la Rivastigmine (Exelon®), la Galantamine (Reminyl®) et la Mémantine (Ebixa®). Ils appartiennent à 2 familles de médicaments : les anticholinestérasiques et les antiglutamates. D'un côté les inhibiteurs de l'acétylcholinestérase (Donépézil, Rivastigmine et Galantamine) permettent de prévenir la dégradation de l'acétylcholine. L'acétylcholine (ACh) a un rôle crucial dans les systèmes nerveux périphérique et central, notamment dans la transmission et la plasticité synaptique ainsi que dans la synchronisation neuronale. Étant donné que les neurones cholinergiques situés dans le prosencéphale sont les plus atteints dans la MA, les niveaux d'acétylcholine sont affectés au cours de la maladie compromettant les fonctions synaptiques via la perte des signaux neurotrophiques. Ce type de traitement permet, entre autres, d'augmenter la biodisponibilité cérébrale de l'ACh, facilitant la connectivité synaptique et permettant de lutter de façon modérée contre le déclin cognitif et de réduire certains troubles du comportement. De l'autre côté, la Mémantine qui est un antagoniste des récepteurs NMDA, protège les neurones de l'excitotoxicité, un processus pathologique par lequel le glutamate, le neurotransmetteur excitateur majeur du système nerveux central, induit la mort des neurones par une entrée massive de calcium dans les neurones post-synaptiques suite à une hyperstimulation des récepteurs AMPA et/ou NMDA.

Une nouvelle catégorie d'approche thérapeutique a émergé, basée sur l'immunothérapie. Il s'agit d'une biothérapie à base d'anticorps humanisés dont l'objectif est d'éliminer les protofibrilles d'Aβ. Récemment, le Lecanemab a été autorisé sur le marché américain par la Food Drug Administration (FDA). Il s'agit d'un anticorps monoclonal humanisé IgG1 qui lie avec une grande affinité les protofibrilles solubles d'Aβ. Il a été montré à ce sujet une réduction des marqueurs amyloïdes dans les phases précoces de la MA, résultant dans un ralentissement du déclin cognitif avec 18 mois de traitement, bien que des effets secondaires soient observables tels que des œdèmes cérébraux, des fibrillations atriales, des angines de poitrine et des syncopes [113]. Avant le Lecanemab, la société Biogen avait développé l'Aducanumab et l'avait par la suite commercialisé après avoir

obtenu l'approbation de la FDA. Toutefois, cette autorisation est sujette à controverse car les 2 études cliniques sur lesquelles repose cette autorisation ont révélé des résultats contradictoires et n'ont pas atteint la phase 3 des essais cliniques. Par ailleurs, la European Medicines Agency (EMA) a refusé de délivrer une autorisation pour le marché européen.

Au-delà des traitements symptomatiques, les patients pris en charge peuvent bénéficier également de soins paramédicaux. Tout d'abord, les patients et leurs proches ont accès à un soutien psychologique visant à aider à faire face aux difficultés quotidiennes, tout en conservant le lien social et rompre l'isolement. De plus, les patients peuvent recevoir des thérapies basées sur la cognition, en particulier la stimulation cognitive, qui vise à préserver les fonctions cognitives et la revalidation cognitive, qui a pour objectif de pallier le déficit cognitif grâce à la rééducation neuropsychologique. Enfin, les patients peuvent bénéficier de thérapies visant à maintenir l'activité physique pour préserver le plus longtemps possible la mobilité des personnes concernées et profiter également de ses bienfaits sur les fonctions cognitives. Pour combattre certains troubles comme le trouble du sommeil ou l'anxiété, le patient peut bénéficier de techniques telles que des massages et de la méditation. Pour finir, les patients peuvent bénéficier des thérapies visant à améliorer leur humeur afin d'encourager le bien-être à l'instar de l'aromathérapie, la luminothérapie ou la musicothérapie.

## 2. Caractéristiques physiopathologiques

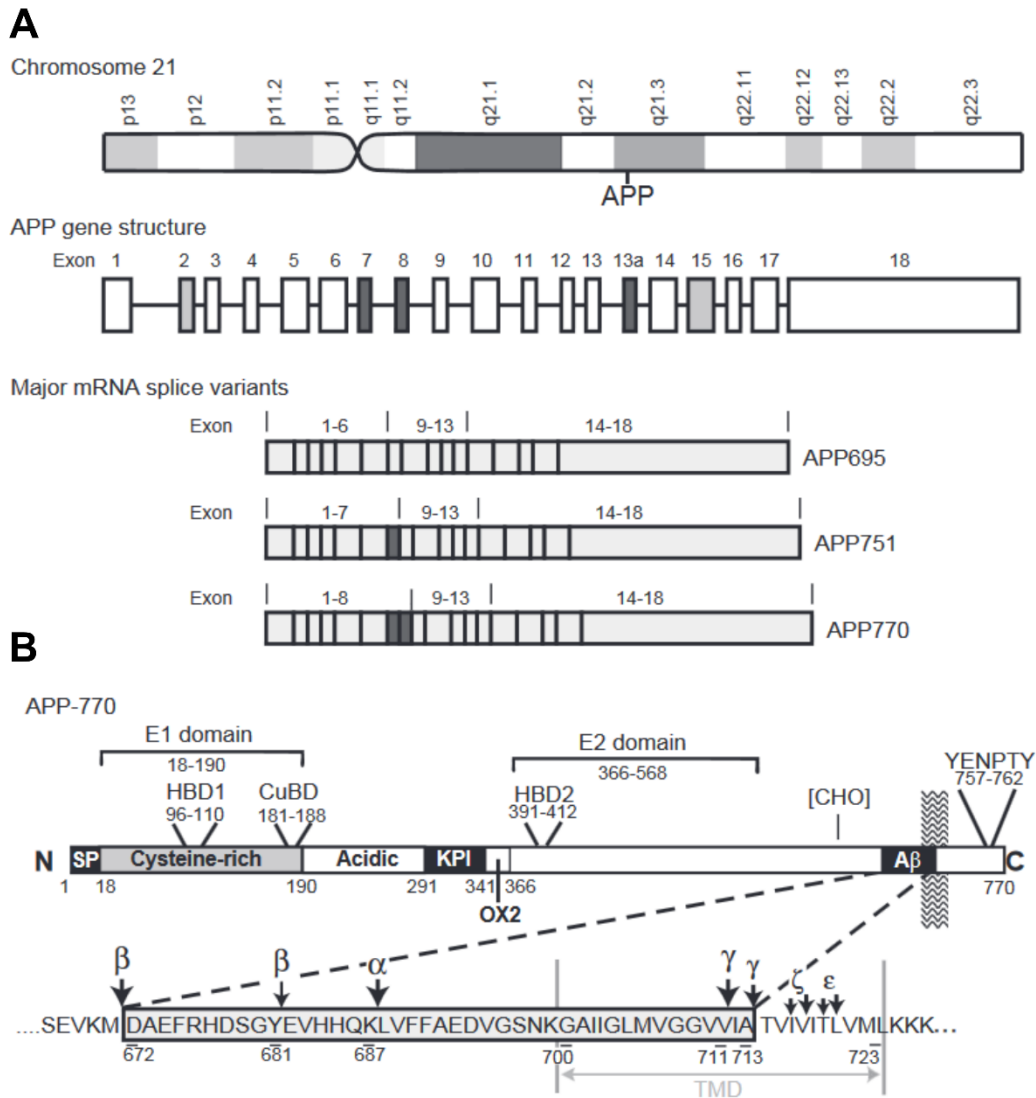
La MA provoque une dégénérescence progressive des neurones, engendrant un déclin cognitif graduel, accompagnée d'une inflammation et de défauts synaptiques majeurs. Les principales caractéristiques de la MA sont :

- L'accumulation extracellulaire des peptides A $\beta$  dans les plaques séniles, interférant avec la communication neurone/neurone au niveau des synapses et contribuant éventuellement à la mort cellulaire [409].
- Le dépôt intracellulaire anormal de la protéine Tau sous la forme d'enchevêtrements neurofibrillaires, bloquant le transport des protéines cargo à l'intérieur des neurones. Il s'agit d'un moteur majeur de dysfonctionnement neuronal et de mort cellulaire, étroitement lié à la progression clinique de la maladie [179, 243].

Finalement, les dépôts extracellulaires d'A $\beta$  et les enchevêtrements intracellulaires de Tau provoquent des dommages irréversibles dans le cerveau, entraînant une atrophie de ce dernier et une perte de la fonction cognitive.

### *i. Amyloidopathie et Plaques amyloïdes*

L'Amyloid Precursor Protein (APP) est une protéine transmembranaire essentielle de type I avec un grand domaine extracellulaire et un court domaine intracellulaire, codée par le gène du même nom, situé sur le chromosome 21 (Figure 5A). L'APP a au moins 10 isoformes différentes allant de 640 à 770 acides aminés (Figure 5B). Bien que l'APP soit une protéine ubiquitaire dans le corps humain, l'APP695 est la forme prédominante dans le système nerveux central, en particulier dans les synapses des neurones. Ici, l'APP joue un rôle important dans divers processus cellulaires tels que l'adhésion, l'interaction et la survie cellulaire [376], la croissance et la motilité des neurites [336], la régulation de la formation et de la réparation des synapses [364] et le transport axonal antérograde [457].



**Figure 5 : Structure du gène, de l'ARNm et de la protéine APP.** (A) Le gène APP est situé sur le chromosome 21q21.3. Le gène comporte 18 exons. L'épissage différentiel de l'ARNm des exons 7 et 8 (gris foncé) peut conduire à l'expression d'isoformes de 695, 751 et 770 acides aminés. Les exons 2 et 15 (gris clair) sont épissés dans l'APP695 et la L-APP, respectivement. (B) Structure de la protéine. L'APP possède un peptide signal N-terminal (SP). Le domaine E1 comporte un domaine de liaison à l'héparine (HBD1) et un domaine de liaison au cuivre (CuBD) ; le domaine E2 contient un second domaine de liaison à l'héparine (HBD2). APP751 et APP770 contiennent un inhibiteur de la protéase de Kunitz (KPI) et un domaine antigène Ox-2. Entre les régions E2 et Aβ se trouvent deux sites potentiels de glycosylation liée à l'azote (CHO). Dans cette région, il y a également un site potentiel d'attachement à la chondroïtine sulfate qui est formé lorsque l'exon 15 est épissé. La séquence d'acides aminés de la région Aβ est représentée avec les sites de clivage de la sécrétase. Le domaine C-terminal intracellulaire contient un motif de triage YENPTY. TMD, domaine transmembranaire. (Source : [96])

Le clivage protéolytique de l'APP joue un rôle crucial dans la pathogenèse de la MA. Son clivage par l' $\alpha$ -sécrétase ou la «  $\beta$ -site APP cleaving enzyme-1 » (BACE1 or  $\beta$ -sécrétase), initie respectivement les voies non amyloïdogéniques ou amyloïdogéniques.

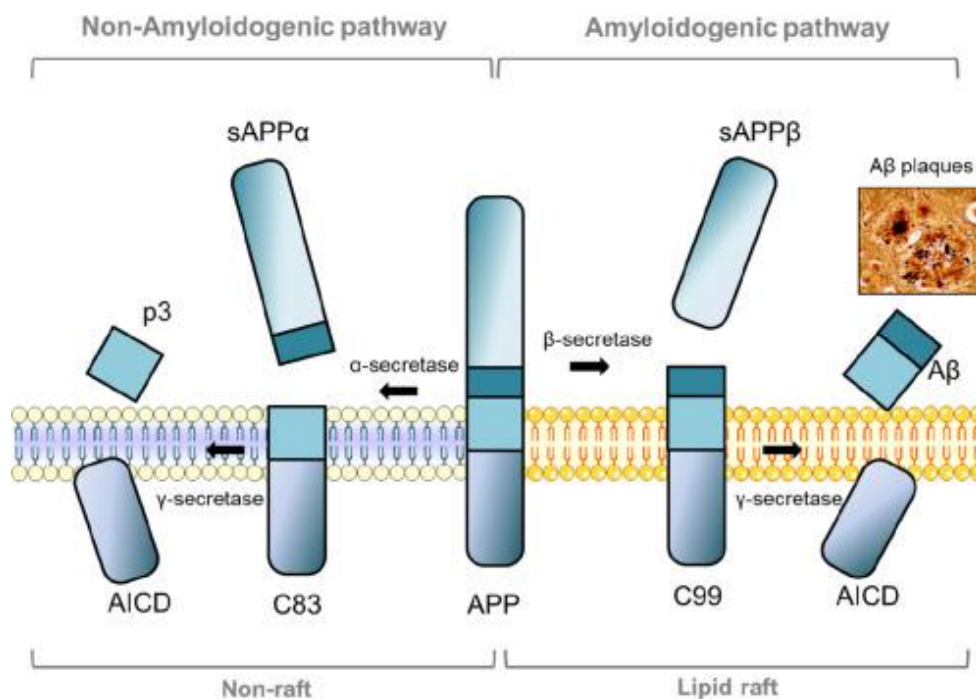
Dans la voie non amyloïdogénique, l'APP est clivée par l' $\alpha$ -sécrétase (ADAM10) à la membrane plasmique, produisant un fragment extracellulaire soluble (sAPP $\alpha$ ) et un fragment transmembranaire C-terminal  $\alpha$  (CTF $\alpha$ ). Cette dernière est un substrat de la  $\gamma$ -sécrétase, un complexe protéique composé de la nicastrine, d'APH1 ainsi que des présénilines 1 et 2 (PSEN 1 et 2) qui génère un fragment correspondant au domaine intracellulaire de l'APP (AICD) et un peptide de 3kDa, p3, résultant de l'espace entre les sites de clivage de la  $\alpha$ - et  $\gamma$ -sécrétase (Figure 6).

Dans la voie amyloïdogénique, l'APP est clivée principalement dans les endosomes précoces par la  $\beta$ -sécrétase BACE1 pour produire un fragment soluble  $\beta$  (sAPP $\beta$ ) et un fragment transmembranaire  $\beta$  (CTF $\beta$  ou C99), qui est



ensuite clivé par la  $\gamma$ -sécrétase pour donner le même AICD et un peptide de 4 kDa, le peptide  $A\beta$  résultant de l'espace entre les sites de clivage de la  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase [326, 464] (Figure 8). Le fragment AICD peut ensuite se transloquer au noyau où il peut réguler l'expression de certains gènes, y compris l'induction de gènes apoptotiques.

Le clivage du  $CTF\beta$  par des caspases peut conduire à la production du peptide neurotoxique C31 [287]. De plus, le  $CTF\beta$  peut subir le clivage par la  $\gamma$ -sécrétase à différents sites, ce qui génère des fragments de clivage de 43, 45, 46, 48, 49 et 51 acides aminés qui sont ensuite clivés pour produire les principales formes finales du peptide  $A\beta$ , l' $A\beta_{40}$  et l' $A\beta_{42}$ , dans les compartiments endocytiques [339, 439]. Additionnellement, la  $\beta$ -sécrétase étant abondante dans les neurones, elle pourrait accélérer la voie amyloïdogénique dans le cerveau, impactant la survie neuronale. En somme, des mutations dans les enzymes de cette voie protéolytique ont été associées à des processus de neurodégénérescence et désignées comme cause des formes précoces de la MA, car nombre de ces mutations modifient l'équilibre entre les espèces d' $A\beta$  générées après le clivage de l'APP [3, 59, 99, 486]. Les formes les plus courantes d' $A\beta$  dans le cerveau humain sont l' $A\beta_{40}$  et l' $A\beta_{42}$ . Le rapport de ces deux formes est généralement de 9:1 et des études ont montré que même de légères variations en faveur de l' $A\beta_{42}$  peuvent favoriser la formation d'oligomères, entraîner une toxicité synaptique et conduire à la mort cellulaire [260]. Par ailleurs, l' $A\beta_{42}$  a une plus grande propension à s'oligomériser que d'autres formes d' $A\beta$ , telles que l' $A\beta_{40}$  [91, 379]. Des recherches ont montré que les oligomères d' $A\beta_{42}$  étaient plus toxiques que les monomères, les fibrilles ou les autres formes d' $A\beta$  et qu'ils étaient probablement les principaux promoteurs des plaques amyloïdes, cohabitant dans un équilibre dynamique avec les autres espèces d' $A\beta$  [30, 98, 125, 430]. De plus, des études récentes ont montré que les peptides pyroglutamate- $A\beta$  étaient plus hydrophobes et avaient tendance à s'oligomériser à des concentrations plus faibles, ce qui accélérerait l'agrégation et la neurotoxicité de l' $A\beta_{42}$  [93, 111, 168, 341].



**Figure 6 :** Voies protéolytiques de l'APP humaine. La protéolyse de l'APP humaine dans la voie non amyloïdogène et la voie amyloïdogène. Le traitement non amyloïdogène de l'APP fait référence au traitement séquentiel de l'APP par des  $\alpha$ -sécrétases membranaires, qui clivent le domaine  $A\beta$  pour générer le fragment  $\alpha$ -C terminal  $CTF\alpha$  (C83) fixé à la membrane et le fragment N-terminal  $sAPP\alpha$ . Le  $CTF\alpha$  est ensuite clivé par les  $\gamma$ -sécrétases pour générer le P3 extracellulaire et le domaine intracellulaire de l'APP (AICD). La transformation amyloïdogène de l'APP est réalisée par l'action séquentielle des  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases liées à la membrane. La  $\beta$ -sécrétase clive l'APP en fragments C-terminal  $\beta$  ( $CTF\beta$  ou C99) et N-terminal  $sAPP\beta$ . Le  $CTF\beta$  est ensuite clivé par les  $\gamma$ -sécrétases en  $A\beta$  extracellulaire et en domaine intracellulaire de l'APP (AICD). (Source : [55])

Des études in vitro et sur des modèles animaux de la MA ont montré que les oligomères d'Aβ peuvent provoquer une dégénérescence synaptique, une déficience de la plasticité synaptique, un niveau aberrant de phosphorylation de la protéine Tau associé à une altération du transport axonal, une redistribution des récepteurs membranaires, une résistance à l'insuline, une modification de l'homéostasie calcique, un stress oxydatif et la mort neuronale [79].

Dans le cerveau humain, les peptides Aβ sont normalement régulés par plusieurs processus, tels que la dégradation protéolytique, la clairance cellulaire, le transport actif et la formation d'agrégats insolubles. Les données récentes suggèrent que la dégradation protéolytique au niveau des lysosomes joue un rôle clé dans la régulation des niveaux d'Aβ dans le cerveau et la pathologie associée à Aβ [329].

Au cours de la MA, la pathologie amyloïde progresse dans le cerveau. Les similitudes de conformation entre les peptides neurotoxiques et les protéines prions soulèvent l'hypothèse d'une transmission d'Aβ à la manière des maladies à prions, puisque que l'Aβ partage certaines propriétés avec la protéine prion pathologique (PrPsc), telles qu'une résistance aux protéases [267] ainsi que la capacité de "seeding" [217].

Bien que les peptides Aβ puissent être les facteurs initiateurs de la MA, ils ne sont pas corrélés avec le déclin cognitif survenant au cours de la pathologie. De plus, dans les modèles transgéniques pour l'APP, il n'est pas fait mention de DNF, comme chez les patients atteints de la MA, suggérant que la protéine Tau, pourrait jouer un rôle important dans la pathogenèse de la démence [429].

## ii. Tauopathie et Dégénérescence neurofibrillaire

La dégénérescence neurofibrillaire (DNF) a été décrite pour la 1ère fois comme une des lésions majeures de la MA par Alois Alzheimer en 1907 [5]. Ce n'est qu'à partir de 1985 que la composante primaire des DNFs a été identifiée comme étant la protéine Tau, une protéine associée aux microtubules exprimée principalement dans les neurones [47, 157, 158, 161, 163, 164, 251, 274, 334, 487].



**Figure 7 : Le gène MAPT humain et les isoformes de tau dans le cerveau humain.** MAPT, le gène codant pour la protéine tau humaine, contient 16 exons. Les exons 1 (E1), E4, E5, E7, E9, E11, E12 et E13 sont constitutifs, tandis que les autres sont sujets à un épissage alternatif. E0 et E1 codent les séquences 5' non traduites de l'ARNm MAPT, tandis que E14 fait partie de la région 3' non traduite. E0 fait partie du promoteur, qui est transcrit mais non traduit. Le codon d'initiation de la traduction ATG se trouve dans E1. E4a, E6 et E8 ne sont transcrits que dans les tissus périphériques. Les six isoformes tau du cerveau humain sont générées par épissage alternatif de E2, E3 et E10. Ces isoformes de tau diffèrent en fonction de la présence de 0, 1 ou 2 inserts proches du domaine N-terminal (0N, 1N ou 2N, respectivement) et de la présence de la répétition R2, ce qui donne des espèces de tau à 3 ou 4 domaines de répétition carboxy-terminale (3R ou 4R, respectivement). L'expression de la protéine tau humaine est régulée au cours du développement : dans le cerveau adulte, six isoformes de tau sont exprimées, alors que dans le cerveau fœtal, seule l'isoforme la plus courte est exprimée. Dans le cerveau humain adulte, les niveaux des formes 3R et 4R sont à peu près égaux et l'isoforme 2N est sous-représentée par rapport aux autres : les isoformes 0N, 1N et 2N représentent respectivement ~37%, ~54% et ~9% de la protéine tau totale. L'expression de la protéine tau dans le cerveau humain présente des variations régionales considérables. Cette variation de l'expression de la protéine tau peut contribuer à la vulnérabilité différentielle des régions du cerveau à la pathologie tau. (Source : [474])

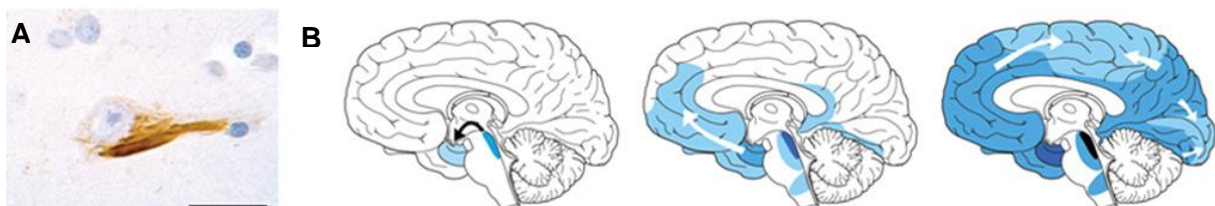
Tau est codée par le gène MAPT présent sur le chromosome 17, produisant une protéine hydrophile se retrouvant dans les axones des neurones en développement et des neurones matures [190, 191, 235, 325]. L'épissage alternatif de 8 des 16 exons de l'ARN messager provenant de la transcription de MAPT, fournit 6 isoformes distinctes (Figure 7), différenciellement exprimées dans le système nerveux central et périphérique [12, 107, 157, 335]. Les différentes isoformes de Tau résultent de l'épissage alternatif de la région N-terminale, responsable de l'interaction avec d'autres protéines du cytosquelette et de la membrane plasmique et de l'épissage alternatif du domaine de liaison aux microtubules (MBD, Microtubule Binding Domain) produisant ainsi des protéines Tau 3R et 4R avec 0 à 2 domaines N-terminaux. Chaque isoforme est présente dans le système nerveux central humain et aurait des fonctions physiologiques différentes. Il est reconnu que, dans le cerveau humain, les isoformes 3R seraient produites au cours du développement tandis que les isoformes 4R seraient produites dès le début de l'âge adulte jusqu'à atteindre des niveaux similaires à ceux des isoformes 3R pour donner un rapport 4R/3R de 1:1 [185, 197, 301]. Il est intéressant de noter qu'il existe des différences dans le ratio suivant les espèces, comme c'est le cas chez la souris qui possède davantage de 3R [301] tandis que chez le rat, l'expression de l'isoforme 4R est nettement supérieure à celle de la 3R [175]. Par ailleurs, une évolution du ratio 4R/3R vers une élévation de l'isoforme 3R par rapport au 4R est un mécanisme suggéré pour expliquer la progression des DNFs [176, 459]. Depuis la découverte de la protéine Tau comme étant la composante primaire des DNFs, des efforts considérables ont été déployés pour mieux comprendre son rôle dans la pathogenèse de la MA.

De plus, les DNFs ont été identifiées dans d'autres maladies neurodégénératives, appelées tauopathies [318, 428]. À l'exception de la MA, la plupart de ces tauopathies surviennent sans dépôts amyloïdes et sont associées à des mutations de Tau, suggérant que la dysfonction de Tau et/ou la formation de neurofilaments contribue(nt) à l'étiologie de la maladie.

La protéine Tau est connue pour jouer un rôle crucial dans l'assemblage et la stabilité des microtubules ainsi que dans le transport axonal et la plasticité synaptique [212, 312, 367]. Dans le contexte de la MA, cependant, Tau est anormalement hyperphosphorylée [284], ce qui perturbe son interaction avec les microtubules, entraînant la relocalisation de Tau dans le compartiment somato-dendritique et la formation d'agrégats [212]. Cette accumulation de Tau dans les neurones perturbe le transport axonal et altère la plasticité synaptique à long terme avec une réduction de la potentialisation à long terme (PLT), un mécanisme moléculaire de renforcement de la connectivité synaptique, provoquant des troubles de la mémoire caractéristiques de la maladie.

Le domaine riche en proline de Tau, qui relie le domaine N-terminal et le domaine C-terminal, contient sept séquences d'acides aminés avec des motifs PxxP, qui permettent l'interaction avec les domaines SH3 de certaines protéines [315, 380]. La phosphorylation excessive de Tau par des kinases telles que CDK5, CAMK2A et GSK3 $\beta$  sur plusieurs résidus spécifiques, tels que la sérine 214 ou la thréonine 231 dans le MBD [119, 426], favorise la formation de feuillets bêta, ce qui contribue à l'agrégation de Tau.

De surcroît, Tau est régulée par isomérisation et de nombreuses modifications post-traductionnelles, telles que la méthylation, l'acétylation ou la O-GlcNAcylation, qui peuvent moduler ses interactions avec d'autres protéines ou ses propres modulateurs (kinases et phosphatases) et exacerbent ou réduisent son état de phosphorylation [169, 210].



**Figure 8 : Propagation de la protéine Tau dans le cerveau.** Les agrégats de protéines présentent une propagation de type prion en conditions expérimentales, ce qui correspond à l'apparition progressive des lésions dans les maladies humaines. **(A)** Inclusion de Tau sous forme d'enchevêtrement neurofibrillaire dans un neurone néocortical d'un patient atteint de la MA. Les barres d'échelle sont de 20  $\mu$ m en A. **(B)** Progression caractéristique des inclusions de Tau spécifiques de la MA au fil du temps (t, flèches noires), déduite des analyses post-mortem de cerveaux. Trois stades sont représentés, les flèches blanches indiquant la propagation supposée des lésions. (Source : [221])

Concernant la distribution spatiale de Tau au cours de la pathologie, Braak et Braak ont décrit un schéma de propagation selon lequel la pathologie Tau commence dans le locus coeruleus et le cortex entorhinal puis se propage à d'autres zones du cerveau [44]. De plus, Braak et Braak ont également démontré que ce schéma de propagation de la tauopathie est corrélé à la détérioration cognitive présente lors du développement de la pathologie et leur a permis d'établir 6 stades de développement de la pathologie divisées en trois phases [44]. La première phase, transentorhinale (stade I et II), est caractérisée par la présence de dégénérescences neurofibrillaires dans la région transentorhinale du cortex (Figure 8AB), qui entraîne des troubles de la mémoire décontextualisée. La deuxième phase, limbique (stade III et IV), implique une atteinte de l'hippocampe, où se situent les fonctions d'apprentissage et de mémoire et conduit à des troubles de la mémoire perceptive et épisodique. Enfin, la phase isocorticale (stade V et VI) correspond à la propagation de Tau à l'isocortex et à l'apparition des symptômes de démence [44, 220, 222] (Figure 8B).

Bien que de nombreuses études aient proposé des mécanismes potentiels tels que la libération d'exosomes ou le relargage synaptique pour expliquer la propagation de Tau, le processus reste mal compris. Des études sur des modèles expérimentaux de la MA suggèrent que ce modèle de progression peut être déterminé par la transmission de protéines mal conformées entre les cellules à l'aide de circuits neuronaux établis [359].

En raison de la grande variété des partenaires de Tau (microtubules, actine, kinases, phosphatases etc.) ainsi que des différentes modifications post-traductionnelles de Tau en condition physiologique et/ou pathologique, il est difficile d'identifier les voies de signalisation importantes pour la modification de Tau et de comprendre comment cela peut impacter la maladie.

### *iii. Interactions Tau-A $\beta$*

L'un des débats majeurs dans la recherche sur la MA a été de déterminer si la pathologie liée à la protéine Tau ou à A $\beta$  apparaît en premier et quelle est la plus importante dans la pathologie [37, 328, 409]. Aujourd'hui, le consensus se tourne vers une interaction entre A $\beta$  et Tau, qui conjointement, vont entraîner une dégénérescence neuronale.

Des recherches ont montré que la pathologie A $\beta$  contribue à des altérations synaptiques dans la phase précoce de la MA et même si l'A $\beta$  joue un rôle essentiel dans la neuropathologie de la MA, l'accumulation de plaques amyloïdes dans le cerveau n'est pas corrélée aux troubles cognitifs. Par ailleurs, les personnes présentant une accumulation anormale d'A $\beta$  et/ou une neuropathologie étendue des plaques amyloïdes, peuvent présenter des fonctions cognitives normales [383, 392]. En revanche, la pathologie de Tau est corrélée au déclin cognitif [18, 150].

De surcroît, des études ont montré que les deux pathologies ont une progression spatio-temporelle indépendante, avec le dépôt de plaques séniles débutant bien avant l'apparition des premiers symptômes cliniques dans le néocortex, avant de progresser dans les régions limbiques, tandis que les DNFs apparaissent en association avec la neurodégénérescence, conduisant à la démence dans les stades plus tardifs de la maladie et se développent initialement dans le locus coeruleus et dans le cortex entorhinal [46, 209]. Malgré ces modèles de propagation distincts, il semblerait qu'il y ait une association entre les deux lésions neuropathologiques. Effectivement, des études ont montré que l'A $\beta$  pourrait être impliquée dans la toxicité liée à Tau en accélérant la phosphorylation de Tau via l'activation de CDK5 [186] ou GSK3 $\beta$  [447], ou en interférant avec l'oligomérisation de Tau via la troncation partielle de Tau, ce qui entraîne une formation plus rapide de filaments mal conformés et une neurotoxicité accrue [37, 139].

Dans l'ensemble, ces informations suggèrent que, bien que les processus de progression des deux pathologies dans la MA pourraient être indépendants, les mécanismes sous-jacents pourraient toutefois s'entrecroiser et avoir des effets synergiques qui pourraient déclencher la pathologie [17, 167]. Cependant, ces mécanismes et leurs interactions demeurent mal compris et nécessitent davantage d'investigations.

### 3. Génétique de la MA

La MA peut être classée en deux catégories en fonction de l'héritabilité génétique et/ou le contexte génétique familial ainsi que l'âge d'apparition des premiers symptômes [264]: (i) les formes précoces de la maladie (EOAD, Early Onset Alzheimer's Disease, avant 65 ans) qui représentent 5-10% des cas et (ii) les formes tardives de la maladie (LOAD, Late Onset Alzheimer's Disease, après 65 ans) qui représentent donc 90-95% des cas [148].

#### *i. Formes monogéniques autosomiques dominantes précoces*

Les formes précoces de la MA sont les formes les plus rares. Ces formes monogéniques sont autosomiques dominantes [264]. On désigne généralement les EOAD comme des formes familiales précoces (FAD, Familial Alzheimer's Disease).

Grâce aux études sur le syndrome de Down (SD), également connu sous le nom de trisomie 21, chez des patients de plus de 35 ans, il a été possible de révéler que l'APP est responsable des formes précoces de la MA à transmission dominante [56]. Effectivement, les individus atteints du SD ont un fort risque de développer la MA après 40 ans. Or, il se trouve que ces individus possèdent trois copies du chromosome 21, où se trouve le gène codant l'APP, engendrant une augmentation des niveaux d'APP. De plus, des cas rares de duplication de la région distale du chromosome 21, qui ne comporte pas le gène codant l'APP, n'ont pas entraîné de MA, ce qui indique l'importance du métabolisme de l'APP dans le processus physiopathologique de la MA [362]. En plus de l'APP, les gènes PSEN1 et PSEN2 sont également responsables des formes monogéniques de la MA [56]. Ces découvertes ont mené à l'élaboration de l'hypothèse de la cascade amyloïde qui stipule que la production excessive d'A $\beta$  et la formation de plaques séniles sont à l'origine de la dégénérescence neuronale.

#### *ii. Formes sporadiques tardives*

Les LOAD sont les formes les plus fréquentes de la MA et sont désignées généralement comme des formes sporadiques à apparition tardive (SAD, Sporadic Alzheimer's Disease), sans modèle de transmission connu ou d'antécédents familiaux de MA détaillés [148, 264, 354].

Les recherches ont montré que l'étiologie des formes sporadiques est multifactorielle et résulte de la combinaison de facteurs environnementaux et génétiques. En ce qui concerne la composante environnementale, l'âge est le principal facteur de risque, suivi du sexe, les femmes ayant deux fois plus de risque de développer la MA après 80 ans [277]. Bien que les taux d'A $\beta$  et Tau ne semblent pas différents entre les hommes et les femmes [126], certaines études ont suggéré que le déclin des taux d'œstrogènes après la ménopause, qui est connu pour améliorer les fonctions cognitives, pourrait être impliqué [281, 461]. D'autres facteurs environnementaux, tels que les facteurs de risques cardiovasculaires (obésité, activité physique faible et tabagisme) et les facteurs psychosociaux (faible niveau d'éducation, activité intellectuelle peu stimulante et variée), sont reconnus comme favorisant le risque de développer la MA [484].

Bien que la contribution génétique aux formes sporadiques de la MA soit débattue, des études sur des jumeaux ont montré que la composante génétique peut être estimée à environ 60-80 % [142], ce qui en fait la maladie multifactorielle humaine présentant le plus haut niveau d'héritabilité devant le diabète (40%) [3] et la maladie de Parkinson (30%) [4].

## 4. Identification des facteurs de risque de la MA et études fonctionnelles de ces gènes

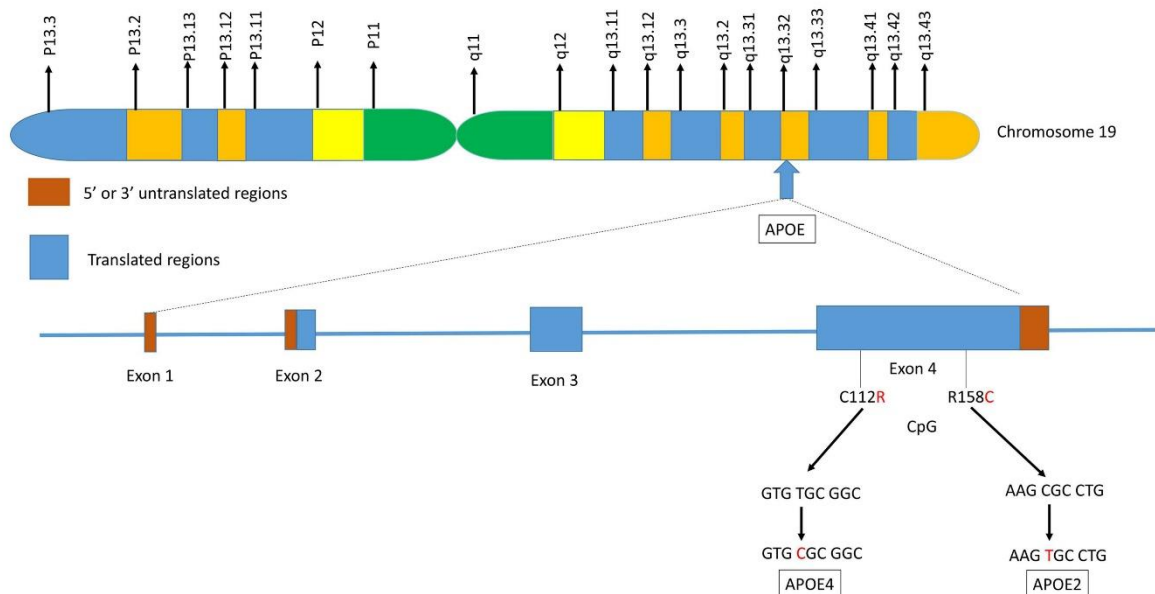
L'étude des formes monogéniques ont permis de mettre l'augmentation de la production d'A $\beta$  comme étant au cœur de la MA, conduisant à l'élaboration de l'hypothèse de la cascade amyloïde. Néanmoins, cette hypothèse reste débattue notamment parce que les essais thérapeutiques basés sur cette hypothèse se sont avérés peu efficaces pour le moment (à l'exception du Lecanemab et de l'Aducanumab, mais toujours en cours d'évaluation clinique). Pour mieux comprendre la pathogenèse de la MA, les chercheurs ont souhaité obtenir davantage d'informations à partir des formes sporadiques, plus nombreuses et avec une forte composante génétique.

### i. APOE : 1er facteur identifié

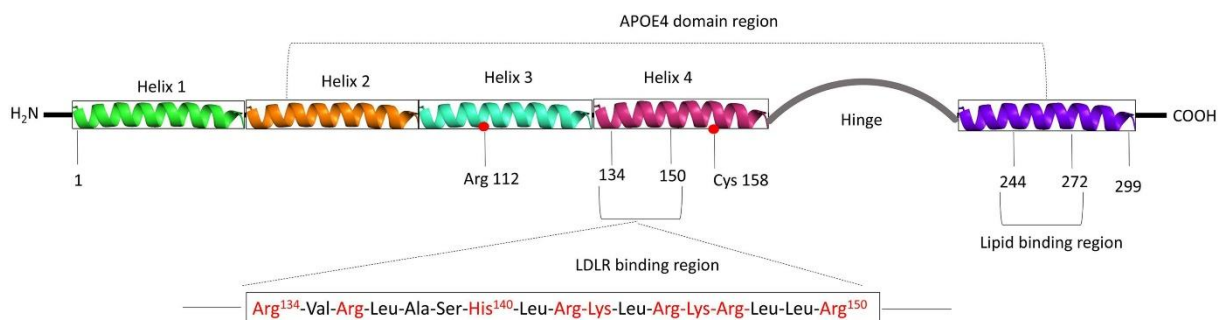
Pendant longtemps, le gène de l'apolipoprotéine E (APOE) a été le seul facteur de risque génétique validé pour la MA, avec des polymorphismes connus pour influencer le risque de développer la maladie [84, 432].

Le gène APOE comporte 4 exons (Figure 9A) et la protéine APOE, une protéine plasmatique qui joue un rôle important dans le métabolisme du cholestérol et la liaison des peptides A $\beta$  [433], contient 4 hélices et une région C-terminale responsable de la liaison aux lipides (Figure 9B). Le gène de l'APOE est constitué de trois allèles communs ( $\epsilon 2$ ,  $\epsilon 3$  et  $\epsilon 4$ ), dont les fréquences de distribution varient dans la population caucasienne. L'allèle  $\epsilon 3$  est le plus fréquent, représenté à 75 %, suivi de l'allèle  $\epsilon 4$ , présent chez 15 % des individus et de l'allèle  $\epsilon 2$ , porté par 8% de cette population. Ces allèles s'associent deux par deux pour former six combinaisons d'allèles possibles, donnant lieu à six génotypes distincts (Figure 9).

A



B





**Figure 9 : Illustration schématique des régions structurelles et fonctionnelles de la protéine apoE.** (A) Localisation et structure du gène APOE sur le chromosome 19q13.32. Le gène APOE comporte 4 exons, composés respectivement de 44, 66, 193 et 860 nucléotides, l'exon 4 codant pour plus de 80 % de la protéine. L'exon 1 contient la région 5' non traduite (5'UTR). La séquence sauvage est apoE3 (Cys112, Arg158). Des mutations ponctuelles dans l'exon 4 génèrent deux polymorphismes nucléotidiques simples (SNP) : une mutation ponctuelle T → C produit l'apoE4 (C112R), tandis qu'une mutation C → T donne l'apoE2 (R158C). (B) Diagramme des domaines structurels de l'apoE humaine. La région N-terminale contient le site de liaison au récepteur (résidus 134-150) et quatre hélices (1-4), la région C-terminale contient la région de liaison aux lipides (résidus 244-272) et les deux domaines sont reliés par une région charnière. La région N-terminale contient les deux positions polymorphes (112 et 158) qui différencient les trois isoformes de l'apoE. La partie inférieure de la figure montre le segment  $\alpha$ -hélicale (résidus 134-150) qui reconnaît le récepteur LDL. Ce segment est riche en résidus arginine et lysine chargés positivement. (Source : [207])

L'allèle  $\epsilon 4$  est significativement associé à la MA, sa seule présence augmentant le risque de développer la MA de quatre fois par rapport au génotype commun  $\epsilon 3/\epsilon 3$  et l'association de deux allèles  $\epsilon 4$  augmente le risque de 12 fois. Cette association est indépendante du sexe et de l'ethnie (à quelques exceptions près) [117, 147]. En revanche, l'allèle  $\epsilon 2$  semble offrir une protection contre la MA.

La fréquence de l'allèle  $\epsilon 4$  est élevée chez les patients atteints de la MA, atteignant 40% dans une population atteinte de SAD, selon une première étude menée en 1993 [71]. Des études ultérieures ont confirmé cette association et montré que le gène de l'APOE n'expliquait que 20% des cas de SAD [239].

Bien que le rôle précis de l'APOE dans la pathophysiologie de la MA ne soit pas encore clairement identifié, APOE a été impliqué dans beaucoup de mécanismes associés à la MA comme la clairance des peptides A $\beta$  dans le cerveau [239]. De plus, la synthèse et la sécrétion d'APOE par la glie, suite à un stimulus stressant, conduit à l'activation de la voie de signalisation MAPK/ERK1/c-Fos, ce qui entraîne l'activation du facteur de transcription AP-1 et l'expression d'APP, aboutissant à la production de peptides A $\beta$  [205].

Des études fonctionnelles ont permis d'obtenir des informations supplémentaires sur le rôle de l'APOE dans la pathogenèse MA. En particulier, il a été démontré que l'expression de l'allèle APOE4 dans des modèles murins transgéniques de la MA conduisait à une neuroinflammation, une redistribution de Tau au niveau somato-dendritique et une neurodégénérescence importante associée à une atrophie corticale, indépendamment du peptide A $\beta$  [416].

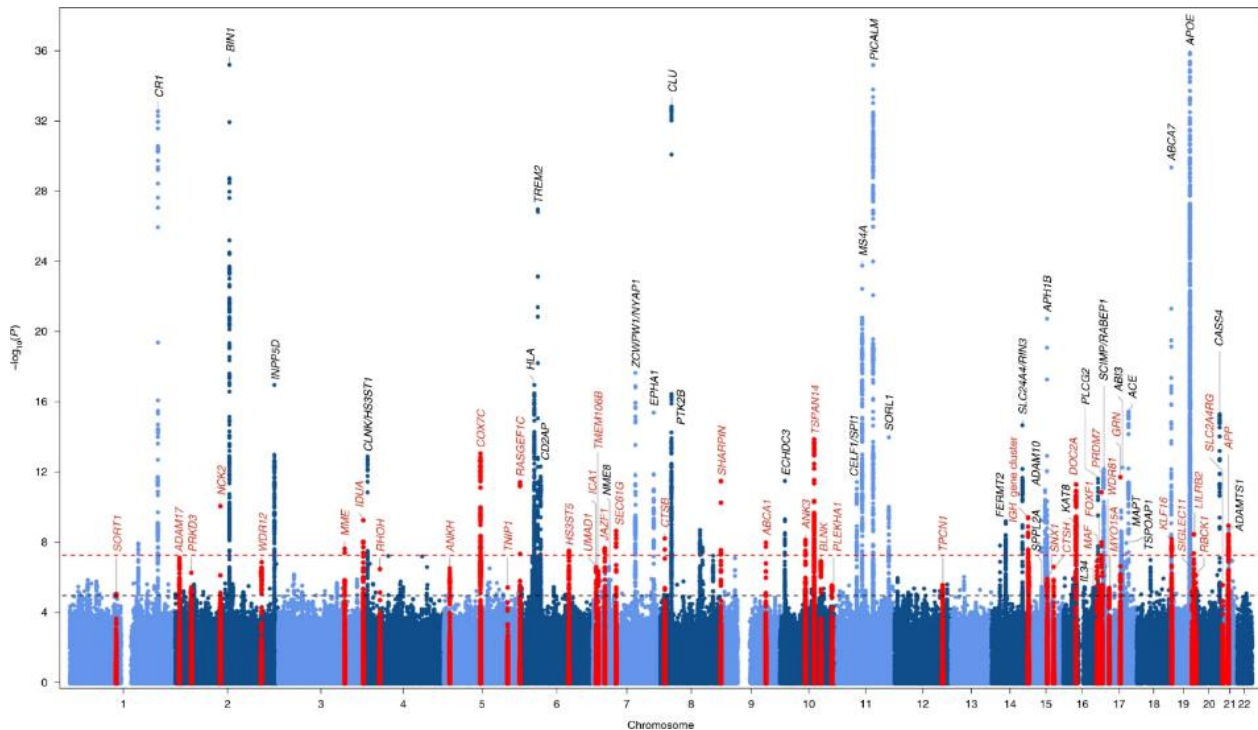
Cependant, étant donné que APOE n'explique que 20% de l'hérédité des formes tardives de MA, il est évident que d'autres gènes jouent également un rôle dans la pathogenèse de la maladie et de nombreux autres ont été identifiés grâce à l'avènement des études d'association pangénomique (GWAS) et des séquençages exome entier au fil des années.

## *ii. Etudes d'analyses pangénomiques (GWAS)*

Les avancées technologiques des quinze dernières années ont permis l'identification de nombreux facteurs de risque génétique pour la MA. Ces découvertes ont été possibles grâce à l'émergence des études d'association génomique (GWAS). Le principe de ces analyses est de comparer la fréquence des variations génétiques entre une population témoin et une population présentant la MA. Ces variations génétiques sont généralement des polymorphismes nucléotidiques simples ou SNPs (Single Nucleotide Polymorphism), mais peuvent également inclure des mutations de type InDel (Insertion/Deletion). Cette comparaison permet de mettre en évidence une surreprésentation d'un variant dans le groupe "malade" par rapport au groupe "contrôle", indiquant que ce variant est impliqué dans la maladie [101].

Depuis 2009, de nombreuses études ont permis de mettre en évidence pas moins de 76 loci [29, 182, 195, 216, 258, 265, 266, 320, 411, 421] (Figure 10). Les variants fréquents, à l'exception d'ApoE, ont un impact relativement mineur sur le risque de développer la MA, avec une augmentation du risque de 10 à 20 %. Cependant, l'association de plusieurs variants pourrait entraîner l'émergence de la maladie. Les variants rares, moins fréquents dans la population, ont un impact plus important que les variants communs, car ils peuvent multiplier d'au moins trois fois le risque [219].

Il est important de noter que les GWAS permettent d'identifier des loci associés à la MA dont le nom est attribué en fonction du gène le plus proche du signal le plus associé, sans pour autant signifier que ce gène est responsable du signal génétique ou qu'il est le facteur de risque génétique de la MA. Toutefois, ces loci peuvent contenir tout un ensemble de gènes, ce qui complique l'identification du gène véritablement responsable de la susceptibilité ainsi que de ses polymorphismes fonctionnels, pour permettre la compréhension du rôle de ces gènes dans la pathophysiologie de la MA [101]. L'enjeu ici, est donc d'identifier le gène véritablement responsable de la susceptibilité et ensuite les polymorphismes fonctionnels afin d'établir un lien entre les facteurs de risque génétique, les signes neuropathologiques de la MA et les processus pathophysiologiques menant à la maladie.



**Figure 10 : Manhattan Plot.** Les loci présentant un signal significatif à l'échelle du génome sont annotés (loci connus en noir et nouveaux loci en rouge). Les variants dans les nouveaux loci sont mis en évidence en rouge. La ligne pointillée rouge représente le niveau de significativité à l'échelle du génome ( $P = 5 \times 10^{-8}$ ) et la ligne pointillée noire représente le niveau de significativité suggestive ( $P = 1 \times 10^{-5}$ ). (Source : [29])

### iii. Etudes fonctionnelles des gènes associés à la MA

Comme précédemment mentionné, les signaux GWAS peuvent impliquer plusieurs gènes pour chaque locus identifié, il est donc impératif d'identifier les SNPs fonctionnels de chaque locus. Cette nécessité a engendré l'émergence des analyses post-GWAS pour caractériser la fonction des SNPs et plusieurs études ont cherché à caractériser et valider les gènes identifiés ainsi que d'identifier leur association avec les processus pathophysiologiques de la MA, en utilisant diverses méthodes et modèles [33, 49, 69, 70, 102, 290].

Il est désormais possible d'élaborer des analyses de signalisations et de réseaux pour identifier des groupes pertinents de gènes associés à des voies de signalisation ou des processus cellulaires ainsi qu'à des maladies spécifiques. En utilisant ces approches, les chercheurs ont identifié des interactions protéiques, caractérisé les mécanismes cellulaires et proposé des rôles biologiques pour les gènes nouvellement associés à la MA, ouvrant ainsi la voie à de nouvelles hypothèses de recherche [89, 141].

Dans le contexte de la MA, l'analyse des réseaux et des voies de signalisation a permis de commencer à mieux comprendre la relation entre les gènes associés à la maladie [204], identifier les mécanismes cellulaires et moléculaires potentiellement altérés dans la maladie [299] et les voies de signalisation spécifiques impliquées dans la pathologie [432]. Ces résultats suggèrent que d'autres gènes associés à la MA peuvent également être impliqués dans des voies de signalisation spécifiques liées à la pathologie, au-delà de l'APOE. Les recherches



continuent donc d'évoluer grâce à ces analyses post-GWAS et l'utilisation d'outils et de méthodes toujours plus sophistiqués. Toutefois, pour mieux appréhender le rôle des facteurs de risque génétique dans la MA, il est nécessaire, ensuite, de réaliser des études fonctionnelles *in vitro* et/ou *in vivo*.

Bien que la compréhension des mécanismes par lesquels les facteurs de risque génétique contribuent au processus pathophysiologique de la MA reste limitée, ces gènes peuvent être assignés à trois catégories de processus cellulaires et/ou moléculaires, selon leurs fonctions physiologiques. Ces catégories comprennent les régulateurs du métabolisme du cholestérol, les régulateurs des processus membranaires tels que l'endocytose et le trafic intracellulaire, ainsi que les régulateurs de la réponse immunitaire, exprimés dans la microglie.

Pour les régulateurs du métabolisme du cholestérol, plusieurs gènes ont été identifiés, notamment APOE, ABCA7 et CLU. APOE est associée à la liaison et à la clairance du peptide A $\beta$ . ABCA7 est impliquée dans le processus protéolytique de l'APP et le dépôt d'A $\beta$  [4, 241, 397, 402] et CLU est associée à la clairance d'A $\beta$  et à la formation de fibrilles amyloïdes [242, 420, 496], ainsi qu'à l'interaction avec BIN1 et Tau [510].

Les régulateurs des processus membranaires incluent SORL1, PICALM, CD2AP, PTK2B, FERMT2 et BIN1. SORL1 est associée à une augmentation de la production de peptides A $\beta$  en inhibant la translocation de l'APP vers le réseau trans-golgien [8]. PICALM est connue pour son implication dans les processus endocytiques et la régulation de l'endocytose de la  $\gamma$ -sécrétase et la dégradation du fragment CTF, ainsi que dans l'association avec la clairance de l'A $\beta$  et la charge amyloïde [182, 313, 322, 347, 493, 502, 508]. CD2AP est associée à l'endocytose de l'APP et à l'intégrité de la barrière hématoencéphalique [85, 338, 444]. PTK2B est un modulateur de la toxicité induite par Tau et colocalise avec les marqueurs de dégénérescence neurofibrillaire [102, 152]. FERMT2 est associée au métabolisme de l'APP et la charge de peptides A $\beta$  [69], ainsi que potentiellement à la toxicité induite par Tau [417]. BIN1 est associée à la production d'A $\beta$ , à la modulation de la toxicité induite par Tau et de son oligomérisation, ainsi qu'à l'interaction avec Tau [60, 70, 90, 189, 268, 426, 437, 469].

Enfin, en ce qui concerne les gènes exprimés dans la microglie et liés à l'immunité, plusieurs gènes ont été identifiés, notamment CR1, CD33 et TREM2. CR1 est associée au mécanisme de phagocytose des synapses par les cellules microgliales [22, 255, 288, 511], tandis que CD33 est associée à la dégradation des peptides A $\beta$  via la phagocytose opérée par la microglie [162, 195, 290, 452]. TREM2 est responsable de la reconnaissance des neurones apoptotiques pour déclencher la phagocytose, mais est également associée au dépôt d'A $\beta$  [219, 421, 496].

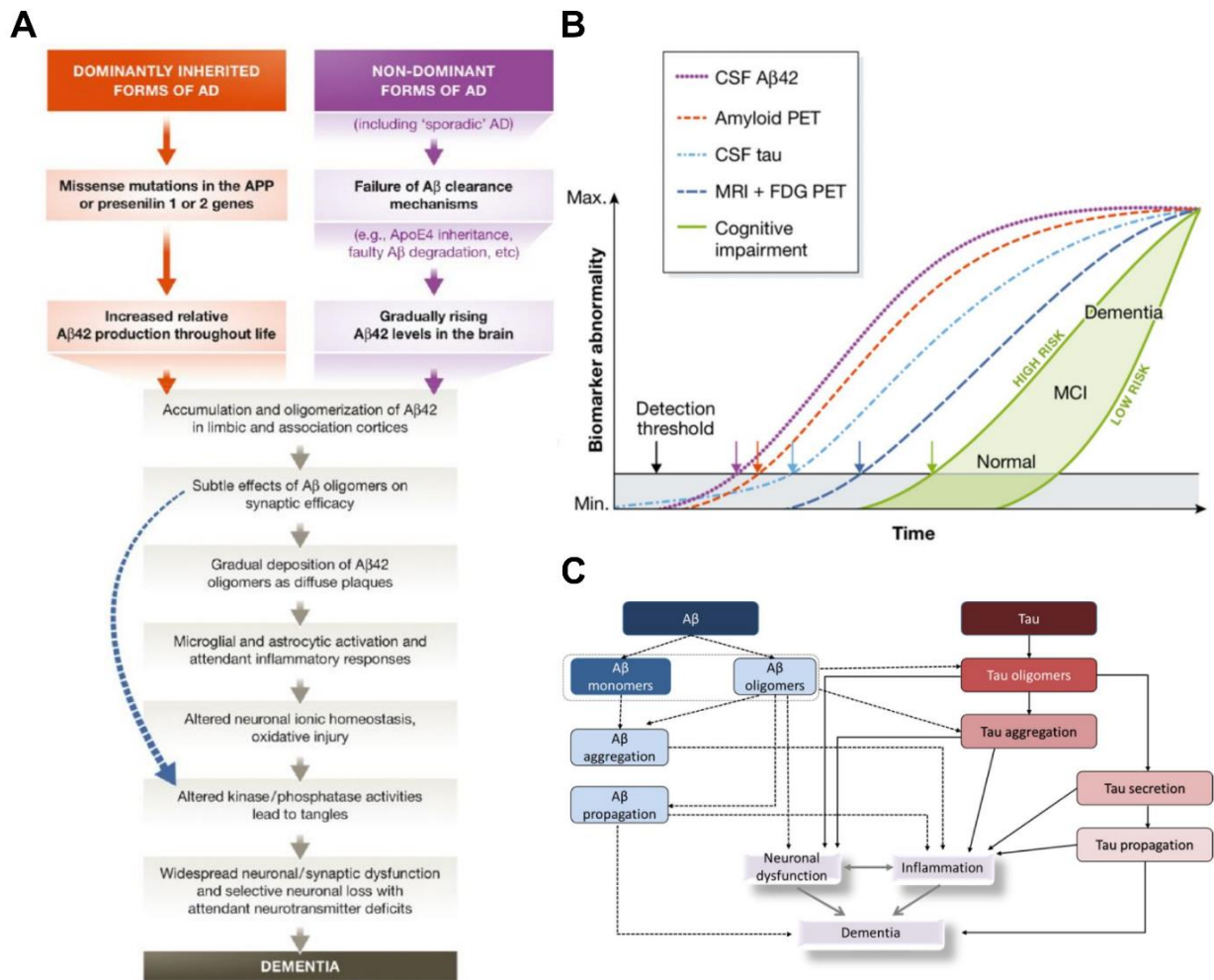
En conclusion, malgré les avancées considérables de la recherche sur la MA, les mécanismes sous-jacents à son développement restent encore en grande partie mystérieux. L'étude des facteurs de risque génétique qui ont été associés à des processus cellulaires et moléculaires impliqués dans le développement de la MA semble une voie prometteuse pour mieux comprendre l'étiologie de la maladie.

## 5. Hypothèses expliquant la pathogenèse de la MA

### *i. Hypothèse de la cascade amyloïde*

L'identification de mutations autosomiques dominantes dans les gènes liés à la production d'A $\beta$  (APP, PSEN1 et PSEN2) comme causes principales de la MA familiale précoce, a conduit à l'établissement de l'hypothèse de la cascade amyloïde (comme mentionné ci-dessus).

L'hypothèse de la cascade amyloïde, telle qu'elle a été formulée en 1991 par Hardy et Higgins, stipule que "la déposition du peptide A $\beta$ , principal composant des plaques, est l'agent causal de la MA et que les dégénérescences neurofibrillaires, la perte cellulaire, les dommages vasculaires et la démence sont une résultante directe de ce dépôt" [178] (Figure 12A).



**Figure 12 : Séquence des événements conduisant à la maladie d'Alzheimer. (A)** Hypothèse de la cascade amyloïde [177]. **(B)** Dynamique des biomarqueurs dans un modèle de cascade pathologique de la MA [213]. **(C)** Modèle intégratif de la cascade amyloïde (Alzforum, Distalz). (Source : [116])

Selon cette hypothèse, l'accumulation d'A $\beta$  causée par divers facteurs tels que l'âge, l'environnement et la génétique, serait le début de la cascade et l'initiateur de toutes les autres caractéristiques pathologiques de la maladie. La formation et le dépôt d'oligomères neurotoxiques dans les plaques séniles, provoquerait l'inflammation, le dysfonctionnement synaptique et l'altération de l'homéostasie calcique. L'activation aberrante de Tau, éventuellement médiée par une augmentation du calcium intracellulaire, entrainerait son agrégation, formant des dégénérescences neurofibrillaires qui, avec les oligomères, affecteraient directement la communication entre les neurones, provoquant finalement la dégénérescence et la mort neuronale [179]. Par conséquent, selon cette hypothèse, la pathologie Tau serait causée par la pathologie amyloïde [179].

Depuis des décennies, la recherche dans la MA s'est principalement basée sur l'hypothèse de la cascade amyloïde, c'est pourquoi le développement d'approches thérapeutiques s'est concentré sur la réduction de l'accumulation d'A $\beta$  dans le cerveau. Cependant, malgré les avancées réalisées dans la compréhension de la pathologie, les résultats obtenus en termes de traitements possibles sont mitigés et la majorité des essais cliniques ont échoué [344]. Bien que le peu voire l'absence d'efficacité puisse s'expliquer par l'aspect tardif de la prise en charge et donc de l'administration du traitement dans des phases avancées de la maladie [311], il semble

qu'une certaine proportion de la population saine présente des dépôts amyloïdes sans développer la maladie [209], suggérant que l'A $\beta$  n'est pas un facteur causal suffisant pour déclencher la maladie [187].

De plus, bien que la perte synaptique due à l'A $\beta$  ait été démontrée [289], elle pourrait ne pas être directement liée à la neurodégénérescence. Cependant, les DNFs sont fortement corrélées aux troubles cognitifs chez les patients atteints de MA [37] (Figure 12B), alors que ce n'est pas le cas avec la pathologie A $\beta$ . Tous ces éléments ont remis en cause la linéarité de l'hypothèse de la cascade amyloïde (Figure 12C) et ont conduit au développement d'un modèle circulaire intégratif qui prend en compte l'interaction entre les pathologies Tau et A $\beta$  et qui, en comprenant la synergie entre les deux, cherche à élucider les bases du déclin cognitif au cours du développement de la maladie [209].

## *ii. Défaits synaptiques*

Comme mentionné, un des changements clés qui survient dans les premiers stades de la MA est la perte synaptique, qui se reflète dans la diminution de la densité des épines dendritiques et qui est étroitement liée au déclin cognitif et des difficultés dans la coordination des activités motrices [229].

Au fur et à mesure de la progression de la MA, l'accumulation d'A $\beta$  et la propagation de Tau augmentent. En ce qui concerne l'effet de l'A $\beta$  sur la synapse, son accumulation dans l'espace extracellulaire autour des épines dendritiques est connue pour provoquer des changements structuraux tels que le rétrécissement dendritique par le remodelage de la f-actine, en particulier au niveau des terminaisons post-synaptiques [129]. Au niveau fonctionnel, différents mécanismes ont été proposés par lesquels les oligomères d'A $\beta$  peuvent modifier les processus de plasticité tels que la potentialisation et la dépression à long terme (PLT et DLT). En premier lieu, il a été décrit qu'ils peuvent altérer la signalisation calcique, provoquant un stress oxydatif, une production de radicaux libres et une perte neuronale [361]. En même temps, les oligomères d'A $\beta$  peuvent modifier l'activité des protéines kinases dans la synapse et donc en dérégulant le trafic des récepteurs au glutamate, AMPA et NMDA. L'internalisation des récepteurs à la suite de changements dans leur état de phosphorylation augmente la DLT. De plus, des niveaux élevés d'A $\beta$  peuvent réduire la recapture du glutamate, entraînant une désensibilisation des récepteurs post-synaptiques et perturbant les signaux glutamatergiques qui provoquerait une perte des épines dendritiques [414].

L'altération des récepteurs au glutamate, accompagnée d'une perte massive de protéines synaptiques, apparaît ainsi comme un mécanisme clé dans le dysfonctionnement synaptique. Au niveau transcriptionnel, la présence d'A $\beta$  peut réduire l'activation de la protéine de liaison à l'élément de réponse AMPc (CREB), ce qui réduirait l'expression des gènes nécessaires à la consolidation des changements au niveau synaptique, réduisant la PLT.

En ce qui concerne le rôle de tau dans le dysfonctionnement synaptique, son hyperphosphorylation produit une déstabilisation générale des microtubules, entraînant une détérioration du transport axonal. Cela peut modifier le trafic des sous-unités du récepteur au glutamate et d'autres protéines vers la membrane post-synaptique, réduisant ainsi les courants post-synaptiques excitateurs ou produisant des défauts structuraux [129, 361, 414]. De plus, Tau peut favoriser la DLT à la fois en s'accumulant dans les épines dendritiques, affectant le transport synaptique local et l'insertion des récepteurs du glutamate et en augmentant l'interaction entre les sous-unités GluA2 des récepteurs AMPA et de PICK1, déclenchant l'endocytose des récepteurs AMPA [129, 361, 414]. De plus, Tau peut être libéré dans l'espace extracellulaire où il affecte les récepteurs muscariniques (mAChR).

Dans la MA, il y a une perte de protéines synaptiques, qui est d'autant plus importante pour les protéines post-synaptiques [129]. Cette perte est associée à une activation accrue des caspases dans les neurites et les synaptosomes, ce qui désorganise les réseaux de filaments d'actine impactant la morphologie dendritique [170]. Cette dérégulation des protéines synaptiques dans la MA indique leur importance dans la fonction synaptique et peut être liée aux déficiences cognitives chez les patients atteints de la MA [375].

En plus de la perte de synapses liée à Tau et A $\beta$ , il est nécessaire de garder à l'esprit que d'autres dérèglements se produisant dans la MA telles que la dérégulation des fonctions de la microglie et mitochondriales, de la mitophagie ou de l'homéostasie calcique, peuvent également entraîner une perte synaptique [61, 412, 425, 431].

Tous ces éléments sont régulés au niveau génétique et les avancées dans ce domaine ont permis d'identifier des facteurs de risque génétique impliqués non seulement dans le métabolisme de l'APP et l'accumulation de l'A $\beta$  mais aussi dans la fonction microgliale et la toxicité de tau. Ces avancées ont permis de proposer une autre hypothèse centrée sur l'idée que le dysfonctionnement synaptique pourrait être génétiquement induit et que les processus pathologiques, loin d'être linéaires, pourraient être un modèle circulaire avec de multiples points d'entrée qui relient chacune des caractéristiques de la MA avec la dysrégulation des synapses et les troubles cognitifs conséquents [103].

Bien que les données de la littérature soutiennent clairement l'hypothèse de la cascade amyloïde, il est nécessaire de garder à l'esprit que la caractérisation biologique des gènes identifiés par GWAS a été initialement réalisée dans le contexte de cette hypothèse. Il s'agit clairement d'une limitation compte tenu du nombre croissant de nouveaux facteurs de risque génétique, qui pourraient potentiellement conduire à l'identification non seulement de mécanismes dépendants de la toxicité de l'A $\beta$ , mais aussi de mécanismes indépendants de l'A $\beta$  (potentiellement liés à la protéine Tau).

De surcroît, il est important de mentionner qu'un nombre non négligeable des facteurs de risque de la MA sont associés à des processus pathophysiologiques liés à Tau. Parmi ces gènes interagissant avec Tau, une large proportion sont impliqués dans la voie des adhésions focales, en aval des intégrines, qui joue un rôle dans la densité et l'activité synaptique au travers de la modulation de la forme et la stabilité des épines dendritiques. Par ailleurs cette voie de signalisation est impliquée dans l'amyloidopathie et la tauopathie inhérentes à la MA, ce faisant, il est possible de formuler une nouvelle hypothèse centrée sur la synapse pour expliquer l'étiologie de la MA. Il s'agit d'un modèle circulaire où les défauts synaptiques pourraient être l'un des principaux événements pathophysiologiques de la MA d'origine génétique et où la signalisation des adhésions focales serait centrale dans ce processus. Ce modèle implique un cercle vicieux qui intègre les principaux acteurs de la MA, à savoir APP et Tau, avec les facteurs de risque génétique de la MA [103].

### *iii. Défauts du trafic intracellulaire*

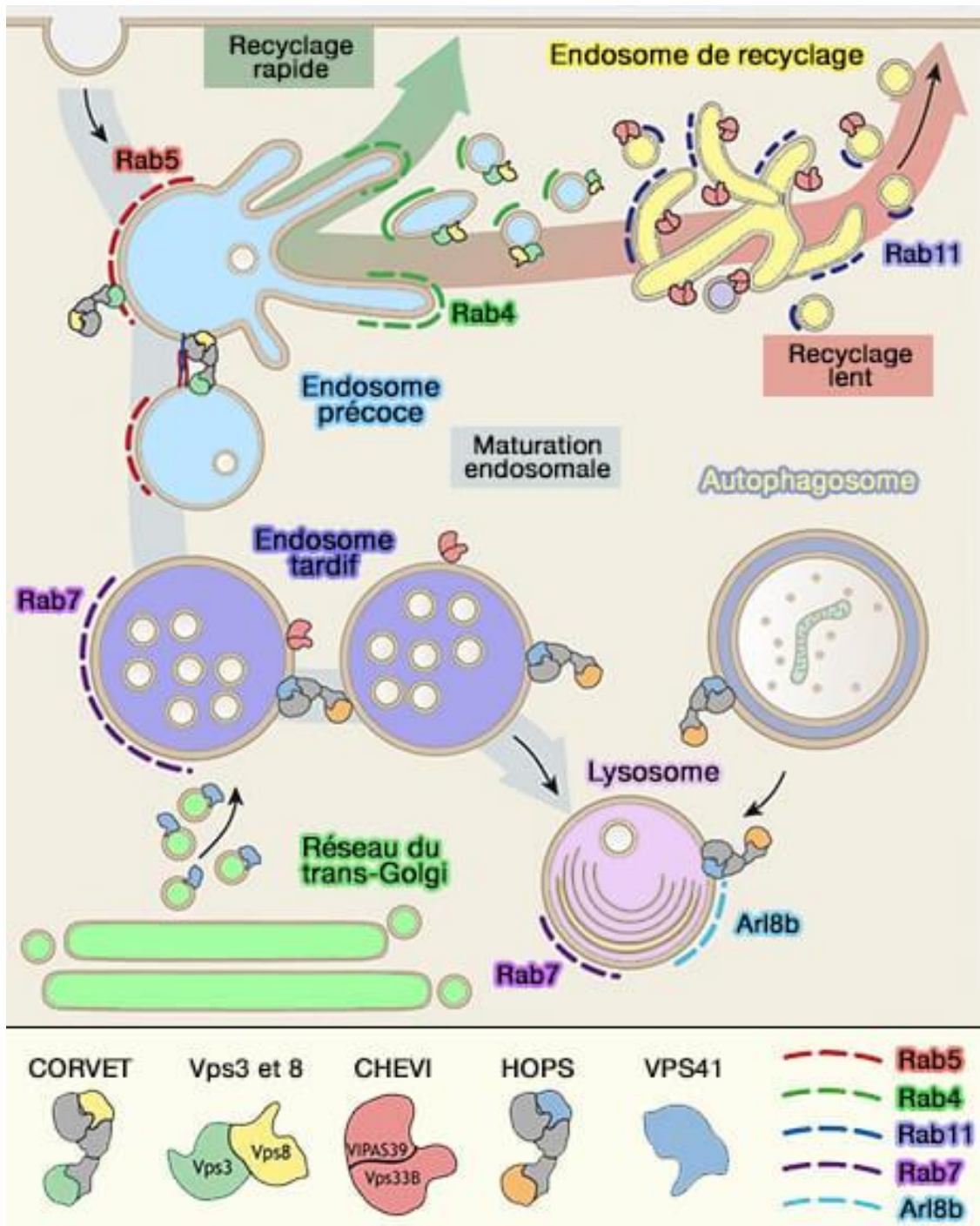
Des études ont démontré que les endosomes précoces élargis étaient les premiers marqueurs cytopathologiques de la MA, indiquant que le dysfonctionnement de la voie endosome-lysosome survient précocement au cours de l'évolution de la maladie, avant même la production anormale d'A $\beta$  [63–65]. Cette observation a conduit à l'émergence d'une hypothèse selon laquelle des défauts du trafic intracellulaire pourraient altérer le bon fonctionnement des cellules, en particulier pour les neurones et que les anomalies ou dérégulations de ces voies peuvent entraîner de graves complications dans le système neuronal, notamment en raison de l'accumulation de protéines indésirables ou mal conformées dans les neurones et de la neurotoxicité qui en découle. En effet, des études animales ont montré que des anomalies des endosomes et des lysosomes, ainsi qu'une dérégulation du transport de protéines cargo, sont des éléments clés de la pathogenèse de la MA [323, 442, 489]. Ainsi, les anomalies liées au système endosomal-lysosomal pourraient jouer un rôle significatif dans la pathogenèse de cette maladie.

Afin de mieux comprendre comment les défauts dans le système endosome-lysosome peuvent contribuer à la MA, il est important de décrire en détail ce système. La voie de signalisation endocytaire est constituée de différents organites impliqués dans la dégradation des protéines, dont les endosomes précoces, les endosomes de recyclage, les endosomes tardifs et le lysosome, qui fonctionnent de concert pour réguler le recyclage et la dégradation des protéines (Figure 13). Cette voie est également connectée à deux autres voies, l'autophagie et la phagocytose, qui convergent vers le lysosome pour la dégradation finale des protéines [262, 450].

Le trafic intracellulaire est initié par le processus d'endocytose médiée par la clathrine (EMC), qui forme des vésicules d'endocytose contenant des protéines en leur sein et à leur surface, qui vont fusionner avec les endosomes précoces, un processus régulé par Rab5 et l'antigène endosome précoce 1 (EEA1) [184]. Les endosomes jouent un rôle clé dans cette voie. Ils agissent comme des stations de tri et peuvent subir des



modifications morphologiques et biologiques, redirigeant les protéines cargos vers les endosomes tardifs et éventuellement vers les lysosomes pour leur dégradation [203]. La maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs est initiée par l'invagination de la membrane endosomale pour former des vésicules intraluminales qui conduisent à la production de corps multivésiculaires (CMV) [230]. Une fois la maturation terminée, les endosomes tardifs fusionnent avec le lysosome pour dégrader les protéines cargos. Les protéines cargos peuvent également être recyclées en étant adressées des endosomes précoces vers les endosomes de recyclage, qui renvoient les lipides membranaires et les protéines à leur surface à la membrane plasmique pour un réemploi ultérieur, médié notamment par Rab11 [201, 282]. Le complexe retromère, un système multimérique, joue également un rôle clé dans le tri des protéines endosomales, en assurant le transport rétrograde des protéines cargos de l'endosome vers le réseau trans-golgien, le recyclage vers la membrane plasmique et le tri vers les lysosomes pour la dégradation [279, 378, 407, 454].



**Figure 13 : Système endosome-lysosome.** L'endocytose commence par la formation de vésicules d'endocytose à partir de la membrane plasmique, qui se déplacent dans la cellule pour fusionner avec des endosomes précoces positifs pour Rab5. Les endosomes précoces fusionnent entre eux et subissent des changements de morphologie, de chargement, de composition lipidique, de position subcellulaire et d'acidité intraluminaire, ce qui conduit à leur maturation en endosomes tardifs positifs pour Rab7 (également connus sous le nom de corps multivésiculaires). Le processus de maturation des endosomes s'accompagne de la génération de tubules de recyclage positifs pour Rab4, qui se rendent directement à la membrane plasmique (recyclage rapide) ou indirectement, via des endosomes de recyclage spécialisés positifs pour Rab11 (recyclage lent). Les endosomes tardifs fusionnent entre eux et avec les lysosomes positifs pour Arl8b. Les endosomes tardifs et les lysosomes fusionnent également avec les autophagosomes, membranes renfermant des protéines cargo cytoplasmiques destinées à la dégradation, ce qui donne lieu à des amphisomes (non indiqué) ou à des autolysosomes, respectivement. Le complexe CORVET est nécessaire à la fusion homotypique des endosomes précoces. Le complexe CHEVI est impliqué dans le recyclage à travers les endosomes de recyclage positifs pour Rab11, tandis que le complexe HOPS est le médiateur des événements de fusion homotypique et hétérotypique entre les endosomes tardifs et les lysosomes. En outre, les complexes HOPS et CHEVI sont nécessaires à la phagocytose (non indiqué). En dehors des complexes, Vps41 assure la médiation du transport des protéines membranaires lysosomales du Golgi vers les endosomes et Vps3 et Vps8 sont impliqués dans une voie de recyclage spécialisée nécessaire au transport des intégrines des endosomes précoces vers les endosomes de recyclage. (Source : [27])

Dans le cas de la MA, les premiers signes de dysfonctionnement de la voie endosome-lysosome, marqués par un élargissement des endosomes précoces [231], ont été étroitement liés au trafic et au clivage de l'APP. Effectivement, des études ont montré que l'APP se localisait dans des structures de type vésicule dans les cellules [124], où le clivage de l'APP peut se produire, augmentant la production de peptides A $\beta$  et la formation de plaques amyloïdes [386]. Ainsi, une altération de la voie endosome-lysosome pourrait indiquer une maturation retardée ou un blocage de la voie d'endocytose.

Des altérations de gènes qui régulent les voies endosomales ont également été observées dans les formes familiales et sporadiques de la MA. Dans les FAD, des mutations de l'APP, des PSEN 1 et PSEN2 perturbent divers composants de la voie endosome-lysosome, affectant le métabolisme de l'APP [171, 448, 485] et engendrant un élargissement des endosomes précoces. Ces mutations peuvent altérer les interactions entre l'APP et BACE1 dans les compartiments d'endocytose, affecter le tri intracellulaire et finalement augmenter la production de peptides A $\beta$  [261].

Pour le cas des SAD, les GWAS ont mis en lumière de nombreux facteurs de risque génétique pour la MA, impliqués dans la voie endosome-lysosome :

(i) SORL1 est un gène qui code pour la protéine SORLA, initialement identifiée comme un récepteur des lipoprotéines de basse densité (LDL) [495]. Plus récemment, des recherches ont mis en évidence un lien entre SORLA et l'APP. En effet, des études ont montré que SORLA agit comme un récepteur de tri pour protéger l'APP de la dégradation par la sécrétase  $\beta$  et donc de la voie amyloïdogénique [9]. SORLA transporte également des peptides A $\beta$  vers les lysosomes et la modulation de son expression peut avoir un impact direct sur la protéolyse de l'APP en peptides A $\beta$  [58, 384, 498]. Outre son rôle dans la protéolyse de l'APP, SORLA transporte également des récepteurs aux neurotrophines BDNF (Brain Derived Neurotrophic Factor) et GDNF (Glia Derived Neurotrophic Factor) [146, 156, 385] et peut avoir un impact sur la fonction synaptique en régulant le trafic de récepteurs de surface tels que TrkB, GFR $\alpha$ 1/RET et EphA4 [156, 385]. En effet, la suppression de SORLA chez la souris entraîne une accumulation de synapsines phosphorylées dans diverses régions du cerveau, ce qui suggère que SORLA peut avoir un effet direct sur la dégradation des synapsines et donc potentiellement sur l'endocytose des vésicules synaptiques [183]. De plus, les neurones KO SORL1 présentent un élargissement significatif des endosomes précoces et une mauvaise localisation de l'APP [245].

(ii) Initialement identifiée en 1998 pour son rôle dans la liaison de récepteurs d'adhésions spécifiques au cytosquelette de la cellule [112, 444], la protéine adaptatrice CD2AP (CD2 Associated Protein), connue désormais en tant que facteur de risque pour la MA [444], est également impliquée dans divers autres processus cellulaires à l'instar de l'endocytose, la morphologie des endosomes en association avec le marqueur des endosomes de recyclage rapide RAB4 [85] et le trafic lysosomal [136]. Des recherches ont montré sur des souris transgéniques et des lignées cellulaires de neuroblastome que la diminution de l'expression de CD2AP entraînait une réduction des peptides A $\beta$  et du ratio A $\beta$ 42:40 et provoquait une diminution des niveaux d'APP à la membrane plasmique,

suggérant que CD2AP régule la voie amyloïdogénique en empêchant l'APP d'être internalisée vers les endosomes précoces où il peut être soumis à protéolyse [283]. A l'inverse, d'autres études ont montré que la diminution de l'expression de CD2AP entraînait une accumulation d'APP dans les endosomes précoces, augmentant ainsi la génération d'A $\beta$  [458] tandis que la surexpression de CD2AP semble augmenter la localisation de l'APP dans les endosomes tardifs, favorisant ainsi sa dégradation [136]. Enfin, des études sur l'homologue de CD2AP chez la Drosophile, Cindr, ont montré que sa délétion altérait la maturation synaptique, le recyclage et la libération de vésicules synaptiques au niveau du compartiment présynaptique des boutons synaptiques, suggérant que CD2AP, comme Cindr, pourrait réguler la neurotransmission et la plasticité synaptique [338].

(iii) PICALM (Phosphatidylinositol Clathrin-Assembly Lymphoid Myeloid) est un gène identifié en 1996, impliqué dans une translocation chromosomique associée aux leucémies [106]. Des études ont ensuite révélé que PICALM était une protéine de liaison à la clathrine qui joue un rôle dans l'endocytose et le trafic entre le réseau trans-golgien et les endosomes [446]. PICALM régule également la morphologie dendritique [52]. Au niveau présynaptique, PICALM facilite l'endocytose synaptique de VAMP2 [151, 180, 181, 252, 254], une protéine essentielle pour la fusion des vésicules synaptiques et la libération des neurotransmetteurs [122]. En outre, PICALM peut recapturer des protéines synaptiques telles que la synaptophysine et la synaptotagmine après l'exocytose des vésicules synaptiques et les envoyer dans des voies de recyclage [151, 493]. Au niveau post-synaptique, PICALM peut réguler l'abondance de GluA2, une sous-unité des récepteurs AMPA, en influençant son endocytose au niveau de la membrane post-synaptique [180, 181], ce qui suggère un possible rôle de PICALM dans le dysfonctionnement des récepteurs AMPA observé dans la MA.

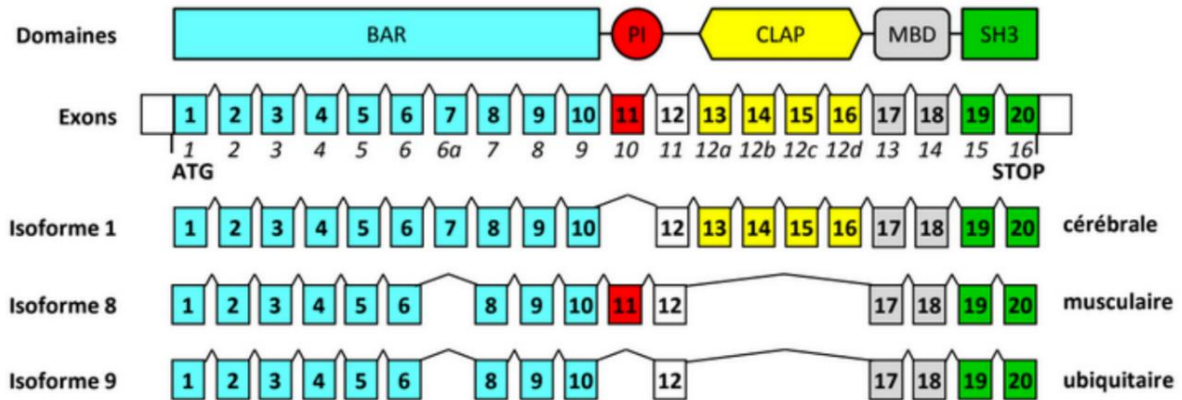
(iv) BIN1 (MYC box-dependent interacting protein-1 or bridging integrator-1), également connue sous le nom d'amphiphysine 2, a été identifiée comme le deuxième facteur de risque génétique le plus associé à la MA, en termes d'association, après APOE [411]. L'isoforme neuronale possède un domaine supplémentaire spécifique, le domaine CLAP, impliqué dans l'EMC, suggérant que BIN1 participe à ce processus dans les neurones. La perte de BIN1 dans des neurones corticaux et hippocampiques de rongeurs entraîne une augmentation de l'endocytose et un élargissement des endosomes précoces positifs pour Rab5, ce qui entraîne des lésions de la membrane endosomale et promeut la propagation de Tau [60]. La perte de BIN1 dans des neurones de rongeurs a également altéré le trafic de BACE1, nécessaire à la production d'A $\beta$  vers les lysosomes [310]. Il est intéressant de noter que des études menées sur des neurones humains indiquent que la surexpression de BIN1 entraîne une augmentation de la taille des endosomes précoces et que la perte de BIN1 entraîne une diminution de leur taille [263]. L'ensemble de ces études suggère que le rôle de BIN1, bien que différent chez les rongeurs et les humains, est crucial dans la régulation de la fonction du système endosome-lysosome dans les neurones, en particulier au niveau des endosomes précoces. De plus, le domaine BAR de BIN1 est responsable du bourgeonnement de vésicules et il est donc possible que BIN1 soit nécessaire à la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs, la perte de BIN1 altérant ce processus et entraînant des modifications de la taille des endosomes précoces, ce qui peut affecter les voies de trafic en aval. Ces données indiquent que BIN1 pourrait être un acteur majeur dans la progression de la MA et c'est pourquoi ma thèse s'est focalisée sur ce gène.

## 2- Le gène BIN1

### 1. Structure du gène BIN1

Le gène BIN1 a été le premier à être identifié comme ayant une interaction biochimique avec le proto-oncogène Myc [398] et se localise sur le chromosome 2q14 chez l'homme [324]. BIN1 est également appelé amphiphysine 2, car c'est le deuxième membre de la famille des amphiphysines. Il présente 49% d'homologie séquence en termes d'acides aminés avec son paralogue Amphiphysine 1 [275, 340]. Les amphiphysines sont également structurellement apparentées à la protéine de levure RVS 167, impliquée dans l'endocytose [317] et régulateur négatif du cycle cellulaire [26]. A noter que l'amphiphysine 1 est une protéine neuronale impliquée dans

l'endocytose des vésicules synaptiques [26]. Le gène BIN1 est composé de 20 exons qui peuvent être épissés en plusieurs isoformes (Figure 14). Les exons 7, 13, 14, 15 et 16 sont spécifiques du cerveau [54, 115, 456], tandis que l'exon 11 est un exon spécifique du muscle [292, 453, 477]. Dans les muscles de patients atteints de dystrophie myotonique, un épissage incorrect des exons 7 et 11 a été identifié [135], tandis que l'exon 17 est souvent mal épissé dans le cancer, entraînant un manque de liaison à c-Myc [143]. Les isoformes 1, 2, 3, 5, 6, 7 de BIN1 sont exprimées dans le cerveau, l'isoforme 4, 8, 12 sont spécifiques des muscles et les isoformes 9 et 10 sont exprimées de manière ubiquitaire [437].



**Figure 14** : Représentation schématique des différentes isoformes de BIN1. BIN1 possède de multiples domaines protéiques : le domaine N-BAR, PI, CLAP (Clathrin and AP protein), MBD (Myc Binding Domain) et SH3 (SRC Homology 3 domain). Les domaines NBAR, MBD et SH3 sont communs à toutes les isoformes. L'isoforme ubiquitaire ne possède ni exon 7 ni domaine PI ni domaine CLAP. L'isoforme musculaire est caractérisée par la présence du domaine PI. L'exon 7 et le domaine CLAP sont spécifiques de l'isoforme cérébrale.

## 2. Organisation de la protéine BIN1

### i. Organisation des différents domaines protéiques de BIN1

La protéine BIN1 possède plusieurs domaines protéiques distinctifs (Figure 14) :

(i) le domaine N-BAR codé par les exons 1 à 10, est présent dans toutes les isoformes et permet de lier les membranes lipidiques sous une conformation dimérique. Ce domaine joue un rôle clé dans la génération et la détection de la courbure membranaire [134, 353], avec une hélice amphipathique N-terminale qui s'insère dans des membranes pour favoriser leur courbure et une surface chargée positivement du domaine BAR qui interagit avec la membrane chargée négativement pour détecter et maintenir la courbure [353]. La capacité de moduler la courbure membranaire est essentielle pour la tubulation membranaire, la formation de bourgeonnements/vésicules dans les neurones et les cellules musculaires squelettiques, ainsi que pour la formation d'endosomes. Par ailleurs, la dimérisation du domaine BAR est une condition préalable à cette fonction et le domaine est impliqué dans l'homo ou l'hétéro dimérisation avec l'amphiphysine 1 (AMPH1) [370, 423]. Un argument en faveur de l'hétérodimérisation provient également du fait que la délétion de AMPH1 entraîne la perte à la fois de AMPH1 et de BIN1 dans le cerveau [345].

(ii) Le motif de liaison des phosphoinositides (PI) est une courte séquence polybasique codée par l'exon musculaire 11 [54, 327, 477]. Ce motif PI augmente l'affinité de BIN1 envers les lipides chargés négativement PI(4, 5)P2 et/ou PI3P et PI5P [135, 270], ce qui peut potentiellement cibler BIN1 vers des compartiments membranaires tels que les tubules T et des invaginations de membranes plasmiques spécifiques des muscles [34, 134, 353, 365, 443],

(iii) Le domaine spécifique des neurones, appelé le domaine CLAP (Clathrine et Adapter Protein AP-2), est codé par les exons 13 à 16 et se trouve exclusivement dans les isoformes cérébrales [371, 456]. Il est responsable de la liaison aux protéines endocytiques clathrine et AP2, ce qui lui confère un rôle potentiel dans l'EMC [370].

(iv) Le domaine de liaison à c-Myc (MBD, Myc Binding Domain) est codé par les exons 17 et 18 [398], mais l'épissage alternatif de l'exon 17 conduit à la perte de cette interaction [477, 478]. L'expression anormale de BIN1



et une interaction aberrante BIN1-Myc peuvent influencer le processus d'apoptose médié par Myc [114, 137, 399, 477].

(v) le domaine SH3 (Src Homology 3), qui est codé par les deux derniers exons (19 et 20), est commun à toutes les isoformes de BIN1, se lie aux motifs riches en proline [500], permettant des interactions protéiques avec bon nombre de partenaires, tel que Tau, ce qui est particulièrement intéressant dans le contexte de la MA. Par ailleurs, l'interaction BIN1-Tau, régulée par la phosphorylation de Tau, présente un intérêt particulier et, dans la MA, cette interaction serait diminuée [154].

## *ii. Régulation de la protéine BIN1*

Les fonctions de BIN1 sont régulées par des changements dans l'épissage des exons, ce qui a un impact sur la conformation de BIN1 qui peut adopter une forme ouverte ou fermée. Plus précisément, il a été démontré que l'inclusion du motif PI et du domaine SH3 régulent ces conformations ([249, 393] avec les domaines BAR + PI établissant une liaison intramoléculaire avec le domaine SH3 dans l'isoforme 8, tandis que la liaison du PI(4,5)P2 au motif PI favorise la conformation ouverte et l'interaction avec des partenaires protéiques comme la dynamine sur les membranes riches en PI(4,5)P2 [249]. De plus, l'épissage différentiel de l'exon 7 du domaine BAR a été impliqué dans la modulation de l'interaction protéine-protéine avec la dynamine [115]. De surcroît, des mutations de BIN1 localisées dans le domaine SH3 ont été associées à diverses myopathies centronucléaires, affectant la conformation de BIN1 et sa liaison à la dynamine [327, 393].

Les études ont également montré que BIN1 pouvait être régulée par phosphorylation [193, 293]. En condition basale, il existe une interaction intramoléculaire entre le domaine SH3 et le motif riche en proline du domaine CLAP de l'isoforme 1 de BIN1, qui rend le domaine SH3 indisponible pour les interactions intermoléculaires avec d'autres protéines telles que Tau. La phosphorylation de la thréonine T348 dans le domaine CLAP à proximité du PRD, par la kinase Cdk2/5, a été associée à l'ouverture conformationnelle de BIN1 et facilite l'accès de partenaires au domaine SH3 en augmentant sa disponibilité, conduisant à une augmentation de l'interaction BIN1-Tau dans les neurones.

## 3. Expression et localisation de BIN1 en contexte physiologique

BIN1 est exprimée de façon ubiquitaire dans le corps entier et fortement dans les muscles squelettiques et cardiaque et dans le cerveau [54, 398].

Selon les études actuelles, BIN1 est, dans le cerveau, principalement exprimé dans la matière blanche et la glie dans des conditions physiologiques normales [2, 387, 389]. Plus précisément, BIN1 est prédominant dans les oligodendrocytes, tandis que sa présence dans la microglie est plus faible. Les astrocytes, quant à eux, contribuent peu au signal global de BIN1. Bien que présent dans le cerveau, BIN1 est moins exprimé dans la matière grise par rapport à la matière blanche et la glie [90, 294]. Les différentes isoformes de BIN1 ne sont pas exprimées de manière équivalente dans le cerveau, avec les isoformes 1 et 9 étant les plus abondantes, suivies des isoformes 6, 7 et 10. Les isoformes 2, 3, 5 et 12 sont présentes en quantités moindres [90, 437]. En revanche, les isoformes musculaires 4 et 8 ne sont pas exprimées dans le cerveau.

La répartition des différentes isoformes de BIN1 dans les différents types cellulaires suscite une certaine controverse dans les études, en raison des différentes techniques d'analyse utilisées (analyses génomiques, transcriptomiques et protéomiques). Les isoformes 1, 3, 5 et 7 ont été détectées dans les neurones, sans distinction de sous-type (glutamatergique, GABAergique, cholinergique, sérotoninergique, dopaminergique etc.) [437, 510]. L'exon 7 est caractéristique des formes de haut poids moléculaire, majoritairement exprimées dans les neurones, tandis que les isoformes dépourvues de cet exon sont plutôt retrouvées dans la matière blanche et les oligodendrocytes [389]. Bien que la majorité des études s'accordent à dire que les astrocytes ne participent que très faiblement au signal d'expression de BIN1 dans le cerveau, une étude a tout de même détecté les isoformes 2, 9 et 10 dans des cultures primaires d'astrocytes humains in vitro [437, 510]. Les isoformes 6, 9 et 10

ont été détectées dans la microglie, tandis que peu d'informations sont disponibles sur les isoformes de BIN1 exprimées dans les oligodendrocytes [389].

La localisation intracellulaire de BIN1 et de ses isoformes est également un point d'intérêt. Bien que la fonction et la localisation de BIN1 soient de mieux en mieux comprises dans un contexte physiologique ou pathologique, des études ont montré que BIN1 est préférentiellement localisé dans le cytosol [510] et ponctuellement sous la membrane plasmique des segments initiaux des axones et des nœuds de Ranvier [54]. À ce jour, peu de données sont disponibles sur un possible changement de localisation de BIN1 au cours de la progression de la maladie et sur l'importance d'un domaine spécifique de BIN1 dans ce processus.

## 4. Rôles cellulaires de BIN1

### *i. Processus membranaires*

Les protéines de la famille des amphiphysines sont principalement connues pour leur rôle dans l'endocytose, à la fois dans les cellules neuronales et non neuronales [26, 95, 418, 481]. Elles interagissent avec plusieurs protéines, notamment la dynamine [95], les complexes adaptateurs AP2 [95, 481], la clathrine [300, 371], la synaptojanine [302] et l'endophiline/SH3GL2 [308, 381], associées aux puits recouverts de clathrine, pour réguler l'endocytose. Il est important de souligner que la déphosphorylation de l'amphiphysine 1 et de BIN1 par la calcineurine est nécessaire pour induire l'endocytose [293]. De plus, l'expression exogène du domaine SH3 de l'amphiphysine inhibe la captation de la transferrine dépendante de la dynamine, ce qui traduit une inhibition de l'EMC [340]. Ainsi, il est admis que les amphiphysines régulent le recrutement séquentiel et l'action des effecteurs, parallèlement à la déformation membranaire, au niveau des sites de fission membranaire [445].

De plus, l'orthologue de BIN1 chez *C. elegans*, nommé AMPH-1, colocalise et interagit directement avec RME-1 (protéine de type dynamine et orthologue de la protéine EHD) pour initier la tubulation des endosomes et le recyclage membranaire [343], suggérant que les amphiphysines contrôlent l'endocytose et/ou le recyclage en fonction du contexte. L'interaction fonctionnelle de EHD1 et BIN1 est également supportée par le fait que EHD1 médie le trafic des vésicules et le développement ou le maintien des tubules T dans le muscle. La perte de EHD1 altère la structure du tubule T et la localisation de BIN1 [360].

Des études ont montré que le domaine N-BAR de l'amphiphysine et de l'endophiline est capable de lier les membranes lipidiques et d'enclencher leur invagination en tubules étroits [118, 374, 441]. L'expression exogène de l'amphiphysine 1 ou de l'isoforme cérébrale de BIN1 dans des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) conduit à une distribution diffuse et cytosolique. En revanche, la surexpression de l'isoforme 8 de BIN1 dans des cellules CHO et des cellules musculaires C2C12 mène à la formation de nombreux tubules étroits connectés à la membrane plasmique [270, 427], ressemblant ainsi aux tubules T trouvés dans le muscle squelettique. Par ailleurs, la suppression du motif PI, spécifique de l'isoforme musculaire, réduit fortement la tubulation membranaire induite par BIN1 [39, 135, 304].

En somme, les amphiphysines et notamment BIN1, sont des acteurs clés dans la régulation de l'endocytose, du recyclage et du trafic membranaire et jouent un rôle crucial dans l'équilibre entre fission, trafic et tubulation membranaires, de manière spécifique aux tissus.

### *ii. Trafic intracellulaire*

À l'échelle subcellulaire, les isoformes de BIN1 sont largement distribuées à travers les structures endosomales, y compris les endosomes précoces, les endosomes de recyclage, les endosomes tardifs et même le lysosome [276, 321]. Lorsque BIN1 ne se trouve pas dans les terminaisons synaptiques [60, 70], elle peut être détectée dans les segments initiaux axonaux, les nœuds de Ranvier [54] et proche des DNFs [70, 389]. En fait, il semblerait que BIN1 soit impliquée dans le transport endolysosomal au niveau axonal et pourrait affecter non seulement (i) le processus de protéolyse de l'APP et la génération d'A $\beta$ , mais aussi (ii) la dégradation de Tau par autophagie, (iii) la propagation de Tau via des exosomes et (iv) la genèse de vésicules synaptiques [60, 90, 310].

(i) Dans des cultures primaires de neurones hippocampiques, BIN1 contrôle le trafic endocytaire de l'APP et de BACE1 avec pour conséquence une régulation de la genèse d'A $\beta$  [458]. Par ailleurs, BIN1 est principalement active dans les endosomes précoces axonaux, où elle permet la scission des tubules membranaires, ainsi que dans le compartiment périnucléaire des neurones, favorisant ainsi le recyclage de BACE1 à la membrane plasmique [458]. De plus, BIN1 est impliquée dans le trafic de BACE1 et d'APP vers les lysosomes grâce à un mécanisme indépendamment ou non de l'ubiquitine [310, 458]. Cependant, le rôle de BIN1 dans le tri endosomal de BACE1 n'a pas été confirmé *in vivo*, car les souris ne portant qu'un seul allèle de BIN1 ne présentent aucune altération de ce processus et aucun impact sur les niveaux de fragments C-terminaux de l'APP [13].

(ii) Des études ont montré, dans les phases précoces de la MA, des défauts au niveau de l'autophagie dont la capacité à dégrader les protéines et organites dysfonctionnels est altérée et survenant avant même l'apparition des DNFs [331]. En outre, ces dysfonctionnements sont dus à des facteurs de risque pour la MA qui altèrent le trafic endosomal, tels que BIN1 [352] ou abrogent l'initiation de l'autophagie, tel que PICALM [11, 313]. Or, en situation normale, l'excès de Tau est dégradé soit par la voie autophagique, soit par le protéasome, selon sa structure et ses modifications post-traductionnelles, suggérant que des défauts au niveau de l'autophagie peuvent favoriser l'accumulation de Tau et participer au processus pathologique de la MA. BIN1 est en fait capable de lier directement Tau [60, 70, 268, 291] et son niveau d'expression protéique est inversement corrélé à la propagation de la pathologie Tau *in vitro* [60]. Le mécanisme sous-jacent semble reposer sur la régulation négative du flux endocytaire par BIN1 via son domaine CLAP et via l'activation de Rab5. Dans ce contexte, des niveaux faibles de BIN1 vont entraîner l'accumulation de Tau, favorisant la formation de nouveaux agrégats intracellulaires, qui vont ensuite perturber les endomembranes et pouvoir se propager en s'échappant dans le cytosol [60].

(iii) En dehors des neurones, BIN1 est également exprimée dans la microglie où son implication dans le trafic intracellulaire pourrait entraîner un dysfonctionnement de la fonction microgliale, qui est d'ailleurs altérée dans la MA et participer à sa pathogenèse. De façon intéressante, des études ont montré que des SNPs de BIN1 associés à la MA pourraient favoriser une expression accrue de BIN1 dans la microglie, affectant l'expression de protéines chaperonnes impliquées dans la clairance de Tau ainsi que la formation des corps multivésiculaires et par extension sur la formation des exosomes. De ce fait, BIN1 pourrait augmenter la libération de vésicules extracellulaires contenant Tau [90]. De plus, les exosomes libérés par les neurones pourraient également être impliqués dans une communication cellulaire entre neurones et microglie, influençant ainsi les fonctions physiopathologiques de la microglie dans le cerveau. Par ailleurs, McAvoy et al., ont récemment mis en évidence des effets non-autonomes de l'isoforme neuronale de BIN1 sur la microglie en démontrant que la délétion de BIN1 dans les neurones excitateurs modulait le transcriptome de la microglie, en activant des voies impliquées dans la neuroinflammation et la production d'espèces réactives à l'oxygène, sans pour autant examiner si cet effet était médié par des exosomes [298].

(iv) Un dysfonctionnement de la transmission synaptique, avec pour conséquence une dénervation cholinergique présynaptique généralisée, est au cœur de la pathologie de la maladie d'Alzheimer [173]. Or BIN1 est capable de lier la dynamine et lors de l'événement de fission membranaire dépendant du GTP qui s'ensuit, l'interaction BIN1-dynamine est capable de réguler la taille des vésicules synaptiques [371, 440].

Ainsi, toute altération de l'expression de BIN1 pourrait affecter non seulement le processus protéolytique de l'APP mais aussi la dégradation et la propagation de Tau et la régulation des vésicules synaptiques [365, 432], via un fonctionnement anormal des endosomes, impactant la communication neuronale et favorisant la propagation de la maladie.

### iii. Régulation du cytosquelette

Plusieurs études ont suggéré que BIN1 joue un rôle potentiel dans la régulation du cytosquelette d'actine. En effet, l'amphiphysine 1 peut directement lier N-WASP [494] et réguler la polymérisation de l'actine lors de la phagocytose [49]. De plus, l'orthologue chez la levure de l'amphiphysine, RVS167, est impliqué dans la régulation de la dynamique et de l'actine en réponse à des stimuli environnementaux [25, 81].

En outre, BIN1 est capable de moduler les réseaux de microtubules en se liant à la région en superhélice de CLIP170 via son domaine BAR, une protéine impliquée dans la stabilité des microtubules [304]. La tubulation membranaire induite par BIN1 dans les cellules HeLa est sensible au nocodazole (un agent dépolymérisant des microtubules) et la diminution de CLIP170 a entraîné une diminution de la capacité de tubulation de BIN1 [304]. Enfin, dans les cellules de neuroblastome humain et dans le cerveau de souris, BIN1 colocalise et interagit avec Tau [60, 70, 268, 291, 400, 426].

## 5. Maladies associées à BIN1

### i. BIN1 et pathologies musculaires

BIN1 est un gène dont des mutations sont responsables de la myopathie centronucléaire (MCN) et il est impliqué dans la dystrophie myotonique (DM).

Dans le cas de la MCN, des mutations germinales dans le gène codant BIN1 provoquent une MCN autosomique récessive, une maladie congénitale rare caractérisée par une faiblesse musculaire non progressive apparaissant à la naissance ou dans la petite enfance [38, 39, 77, 270]. Les patients atteints de MCN présentent une augmentation des noyaux centralisés et une atrophie des fibres musculaires non liée à une régénération musculaire excessive [38, 39]. Plusieurs mutations germinales homozygotes dans le gène codant BIN1 ont été signalées chez les patients atteints de MCN, notamment des changements de sens dans l'hélice amphipathique et le domaine BAR, des mutations du codon stop dans le dernier exon tronquant le domaine SH3 et une mutation dans le site d'épissage donneur de l'exon 11 [38, 39, 77, 270]. Alors que l'expression de BIN1 ne semble pas altérée, les mutations du domaine N-BAR ou l'absence du motif PI diminuent fortement les propriétés de tubulation membranaire de BIN1. D'un autre côté, les troncatures du domaine SH3 altèrent à la fois la liaison intramoléculaire de BIN1 et sa liaison à la dynamine 2. Il convient de noter que la dynamine 2 est une GTPase impliquée dans le remodelage du cytosquelette et de la membrane et est mutée dans les MCNs autosomiques dominantes [36].

Dans le cas de la dystrophie myotonique, maladie multisystémique caractérisée par une fonte musculaire progressive, une myotonie, des cataractes et des troubles de la conduction cardiaque, la cause provient de l'expression d'ARN mutants contenant des répétitions CUG ou CCUG étendues qui séquestrent les facteurs d'épissage, résultant en un épissage aberrant d'autres ARNm, y compris BIN1. Dans les muscles des patients atteints DM, l'isoforme embryonnaire de BIN1 contenant l'exon 7 et dépourvue de l'exon 11 est exprimée de manière persistante [135].

BIN1 est fortement exprimée dans les muscles squelettiques où son expression augmente au cours de la différenciation *in vitro* des cellules musculaires et l'inactivation de BIN1 inhibe la fusion et la différenciation des myoblastes [54, 270, 398, 478]. Des études sur des modèles animaux ont révélé l'importance physiologique de BIN1 dans les muscles squelettiques. Par exemple, les *Drosophiles* présentant une délétion de l'amphiphysine (dAmph, orthologue de BIN1) sont viables mais incapables de voler et présentent des défauts dans l'organisation des tubules T et le couplage excitation/contraction [54, 374, 478]. Pour autant, elles ne présentent aucun défaut important de l'endocytose ou du recyclage des vésicules synaptiques, suggérant que dAmph est fonctionnellement plus proche de BIN1 que de AMPH1 [374].

Les souris adultes présentant une altération de BIN1 dans le muscle court fléchisseur de doigt (flexor digitorum brevis) ont montré des défauts dans la structure des tubules T et des niveaux de calcium [449]. La délétion de l'exon 11 de BIN1 au niveau du tibia antérieur chez la souris entraîne également des problèmes d'organisation des tubules T et de distribution de la dihydropyridine ainsi qu'une diminution de la force musculaire [135]. Les

modèles canins pour BIN1 ont également montré une mutation spontanée de l'exon qui entraîne une myopathie héréditaire des Dogues Allemands, associée à des défauts structuraux des tubules T [38].

Des études ont également révélé une diminution de l'expression de BIN1 chez les patients souffrant d'arythmie ventriculaire, ainsi qu'une corrélation entre le niveau plasmatique de BIN1, la progression de la maladie et l'insuffisance cardiaque [19, 198]. Des recherches ont également montré que l'expression de l'ARNm et de la protéine de BIN1 est significativement réduite chez les cardiomyocytes défaillants [199]. En plus de jouer un rôle structural dans les tubules T, BIN1 peut réguler le transport des récepteurs Cav1.2 vers les tubules T, ce qui soutient son rôle physiologique dans la fonction cardiaque [200]. Des études ont également montré que l'injection d'un oligonucléotide pour BIN1 chez le poisson zèbre induit un phénotype cardiaque fort, avec une altération des courants calciques transitoires, une diminution de la fréquence cardiaque [199] et qu'un KO complet de BIN1 chez la souris est mortel chez les individus périnataux a priori en raison de graves problèmes cardiaques [316]. Toutefois, cela a été remis en cause par une étude de Cowling et al., qui montre que la mort périnatale est causée par de lourds défauts des muscles squelettiques [88]. De plus, la perte de BIN1 contribue à la délocalisation des canaux calciques de type L de surface, altérant les courants calciques transitoires et contribuant au découplage de l'activité excitation/contraction [95, 418]. La perte de BIN1 s'accompagne également de la perte de Cav3, ce qui peut diminuer la fonction cardiaque et conduire à une cardiomyopathie [391].

En somme, BIN1 semble être essentielle dans le positionnement et le remodelage des tubules T dans les muscles squelettiques et cardiaques. Elle pourrait également jouer d'autres rôles à ce niveau, tels que l'organisation des sarcomères [38, 123].

## *ii. BIN1 et cancer*

En considérant les avancées scientifiques, il a été rapporté que l'expression de BIN1 est altérée dans plusieurs types de cancer, incluant les cancers du sein, du côlon, de la prostate et du poumon, ainsi que des hépatocarcinomes et des neuroblastomes [68, 149, 342, 509]. Des études ont également démontré que la perte d'hétérozygotie ou le mauvais épissage de BIN1 sont corrélés à de mauvais pronostics de cancers ainsi qu'à l'augmentation des métastases [143–145]. Des expériences menées sur des souris dépourvues de BIN1 ont montré que la délétion spécifique de BIN1 dans les glandes mammaires retarde la différenciation du réseau canalaire glandulaire pendant la grossesse, mais n'augmente pas la sensibilité aux tumeurs [68]. Toutefois, lorsque les souris ont été exposées à un agent cancérogène, les tumeurs développées étaient plus agressives et caractérisées par une augmentation de la prolifération, de la survie et de la motilité cellulaire [68]. BIN1 a démontré son rôle dans l'inhibition de la transformation maligne dépendante de MYC et la croissance tumorale, mais seulement lorsqu'il est présent à un niveau normal [236, 398]. Il régule également un autre membre de la famille des oncogènes MYC, N-Myc [192], qui est souvent surexprimé dans les neuroblastomes agressifs [48, 408]. Dans six lignées cellulaires sur huit de neuroblastome surexprimant N-Myc, BIN1 est fortement dérégulée, tandis que sa surexpression dans ces cellules conduit à l'apoptose [438]. La diminution de BIN1 peut contribuer à la malignité des tumeurs en diminuant les processus nécessaires à la différenciation terminale (via la diminution de p21 et p53), en dérégulant Myc et en perdant le contrôle sur la réparation de l'ADN via le mécanisme de réparation de jonction d'extrémité non homologue. Bien que la chimiothérapie soit une approche couramment utilisée pour les diverses tumeurs malignes humaines, de nombreux patients ne répondent pas à ce traitement [45]. Des études ont montré que la réduction de BIN1 augmentait la résistance à cette thérapie, très probablement en perdant le contrôle sur le mécanisme de réparation de l'ADN [366]. En outre, en plus des fonctions nucléaires décrites ci-dessus, BIN1 pourrait jouer un rôle dans la migration et l'invasion des cellules tumorales en remodelant le cytosquelette et la membrane. En fin de compte, il a été conclu que la diminution de BIN1 n'augmente pas fortement le risque de formation de tumeurs, mais favorise plutôt la progression tumorale [363].

## 6. Implication de BIN1 dans la pathologie d'Alzheimer

### *i. Modification de l'expression et de la localisation de BIN1 dans la MA*

En tant que facteur de risque génétique pour la MA, il est crucial de comprendre les changements d'expression de BIN1 qui surviennent au cours de la MA. Plusieurs études s'y sont intéressées, toutefois, ces résultats sont parfois contradictoires, empêchant de statuer sur la nature des variations d'expression de BIN1. Cette divergence pourrait résulter de la régulation différentielle des isoformes de BIN1, d'où l'importance de prendre en compte les aspects transcriptomiques et protéomiques, mais aussi la distribution des variations d'expression des différentes isoformes de BIN1 ainsi que les différents variants associés à la MA, pour comprendre son rôle dans cette maladie. Effectivement, la discussion autour de l'analyse de l'expression de BIN1 au cours de la pathologie est lié au fait que (i) certaines études analysent les niveaux d'ARN tandis que d'autres s'intéressent aux niveaux des protéines [2, 155, 194, 510], (ii) certaines isoformes pourraient diminuer tandis que d'autres pourraient augmenter, variations masquées si aucune distinction n'est faite entre les différentes isoformes et (iii) les types cellulaires cérébraux n'expriment pas les mêmes isoformes et la perte ou l'augmentation d'un type cellulaire peut faire varier les niveaux de BIN1 artificiellement sans que le niveau de BIN1 par cellule ne soit modifié.

De manière détaillée, des études ont révélé des variations dans les niveaux d'ARNm et protéiques de BIN1 chez les patients atteints de la maladie. En 2013, deux études ont été menées pour étudier les variations d'expression de BIN1 dans la MA. Une étude menée par Chapuis et al. a montré une augmentation des niveaux d'ARNm, mais n'a pas confirmé l'impact de cette augmentation au niveau protéique [70]. De son côté, l'étude de Glennon et al. a montré une diminution des niveaux de protéines de BIN1 chez les patients atteints de la maladie, mais n'a pas étudié les niveaux d'expression des transcrits [155]. Malgré cela, le consensus actuel est que l'isoforme 1 de BIN1 diminue tandis que l'isoforme 9 augmente au cours de la maladie [194, 389], probablement en raison de la perte neuronale et de la gliose qui en résulte. Une étude a été menée par De Rossi et al. pour quantifier les niveaux de marqueurs neuronaux, d'oligodendrocytes et de microglie dans des échantillons de matière grise provenant de patients atteints de la maladie. Cette étude a montré que la diminution de BIN1iso1 était liée à une diminution de marqueurs neuronaux et donc à une perte neuronale, tandis que l'augmentation des isoformes de bas poids moléculaire était associée à des marqueurs astrocytaires et microgliaux, correspondant à une activation de la glie qui survient au cours de la maladie [389]. De surcroît, une étude récente a montré que l'isoforme 6 de BIN1 augmentait dans la microglie, soutenant l'idée que les variations d'expression des différentes isoformes sont impactées par les changements de populations cellulaires cérébrales [294]. Ces résultats suggèrent que la MA affecte les niveaux protéiques des isoformes de BIN1 dans le cerveau de manière complexe et qu'il est important de comprendre les mécanismes sous-jacents pour comprendre la MA.

En considérant les changements d'expression, il est possible que des modifications post-traductionnelles, telles que la phosphorylation, jouent également un rôle dans la pathogenèse de la MA. Une étude récente a révélé que le niveau de phospho-BIN1 T348 et le rapport phospho-BIN1/BIN1 étaient significativement plus élevés dans les cerveaux de patients atteints de la MA que dans les cerveaux témoins sains, suggérant que la phosphorylation pourrait être impliquée dans la progression de la maladie [400].

Les modifications épigénétiques, comme la méthylation, sont également étudiées, mais il y a encore peu d'informations disponibles. Des associations entre la méthylation de certains îlots CpG dans BIN1 et la MA ont été établies, mais leur signification doit encore être clarifiée [501].

Enfin, il est important de déterminer si les changements d'expression de BIN1 sont causaux dans l'établissement de la MA ou s'ils sont plutôt une conséquence de la progression de la pathologie. Des études ont montré que des anomalies de localisation et d'accumulation de BIN1, près des dépôts amyloïdes, étaient associées à la MA. Ces anomalies incluent l'insolubilité de BIN1, sa localisation anormale à proximité des plaques séniles dans le cerveau des patients atteints de la MA, ainsi que son accumulation dans des structures amorphes près des noyaux

amyloïdes, suggérant que les changements pathologiques associés à la MA déclenchent cette accumulation de BIN1 à proximité des dépôts amyloïdes. [2, 387].

Pour finir, des études ont montré qu'une augmentation de BIN1 dans le cytosol des neurones pyramidaux CA1 était associée à une diminution de BIN1 dans le neuropile chez les patients atteints de la MA à un stade avancé. De plus, la charge de BIN1 dans le neuropile était négativement corrélée avec la charge de DNFs, suggérant que la mort neuronale était induite par la DNF entraînant une perte axonale [2].

Ces dernières années, des études ont porté sur l'effet de BIN1 sur le risque de développer la MA. Certaines études ont suggéré que BIN1 pourrait affecter la pathologie Tau, tandis que d'autres ont montré une relation étroite avec l'A $\beta$ . En outre, des voies potentielles ont été identifiées, telles que l'inflammation, l'homéostasie du calcium, l'apoptose et plus récemment la voie endosomale, suggérant un rôle unique de BIN1 dans la MA [140, 263, 365, 443].

## *ii. Variants de BIN1 associés à la MA*

En vue de déterminer le rôle des variations d'expression de BIN1 dans la pathogenèse de la MA, il est crucial d'identifier quels variants de BIN1 associés à la MA sont fonctionnels et donc à l'origine du risque attribuable à BIN1 dans le contexte de la MA. Ces variants peuvent être soit non-codants, ils sont situés généralement dans les régions régulatrices de BIN1 et peuvent potentiellement influencer les niveaux d'expression de BIN1, soit codants, ceux-ci ont alors un impact direct sur la protéine et probablement sur ses fonctions cellulaires.

En l'occurrence, les études d'association pangénomiques et les séquençages ciblés ont mis en évidence une association entre les variants de BIN1, dans les régions régulatrices et des performances cognitives réduites [22, 202, 225, 266, 271, 411, 443, 466, 482]. Les études ont montré que la majorité des variants associés à BIN1 sont non fonctionnels et que la plupart n'avait pas d'effet sur l'expression des différentes isoformes de BIN1 comme les SNP rs1060743, rs7561528 et rs12989701 [510]. Cependant, une insertion de 3pb située à environ 28kb en amont de BIN1 (indel rs59335482) est associée à une augmentation de l'activité transcriptionnelle in vitro et des niveaux d'expression de BIN1 dans le cerveau des patients atteints de la MA [70].

Le variant BIN1 rs744373 a été associé à une accumulation plus rapide de Tau liée à A $\beta$ , augmentant ainsi le risque de MA. Effectivement, chez des sujets âgés cognitivement normaux et déficients, l'accumulation de Tau est plus rapide chez les porteurs de l'allèle de risque BIN1 rs744373 par rapport aux porteurs de l'allèle de référence et était davantage prononcée chez les patients présentant une amyloidopathie [131]. Toutefois, ce variant n'a pas été lié aux niveaux d'A $\beta$  mais des niveaux élevés d'A $\beta$  ont été associés à une accumulation subséquente plus rapide de Tau [131]. En outre cette association est d'autant plus importante chez les porteurs de l'allèle rs744373, suggérant que les effets de BIN1 sur Tau agissent en aval de l'A $\beta$  [131]. En outre, il a été montré que l'association entre le variant de BIN1 et le déclin de la cognition et de la mémoire était médiée par une augmentation rapide de Tau [132, 133].

Enfin, le variant BIN1 rs6733839 serait associé à une zone de chromatine active dans la microglie (H3K27ac) qui interagit avec le promoteur de BIN1 dans la microglie humaine selon les données PLAC-seq [497]. Plus précisément, ce variant se situe sur un site de liaison PU.1 dans la microglie et crée un motif de liaison pour le facteur de transcription MEF2, agissant probablement comme un partenaire de liaison pour PU.1 sur ce site. Un autre variant, le variant BIN1 rs13025717, réside également dans un site de liaison PU.1 dans les monocytes. Ce variant affecterait probablement la liaison au site PU.1 en perturbant les motifs de ses partenaires de liaison, tels que SP1 et KLF4 [120, 121]. De plus, ces deux variants ont montré qu'ils perturbaient significativement l'accessibilité de la chromatine ouverte dans le cerveau par rapport aux allèles sauvages [333], suggérant un impact fonctionnel de ces variants sur l'épigénome microgliale.

En somme, l'ensemble des données disponibles suggère un rôle important de BIN1 dans la pathogenèse de la MA, avec des effets sur l'accumulation de Tau et le déclin cognitif.



### *iii. BIN1 et amyloidopathie*

La MA est caractérisée par un dysfonctionnement endocytique précoce [65]. Or, la protéolyse amyloïdogène de l'APP nécessite une voie endocytique fonctionnelle [76]. De plus, de nombreuses études suggèrent qu'une voie de transport endocytique fonctionnelle est cruciale pour le tri de l'APP et de BACE1 dans les endosomes précoces, où l'activité protéolytique de BACE1 est optimale [13, 73], avec un impact important sur la production d'A $\beta$  [13]. Après avoir été synthétisées, APP et BACE1 sont transportées à partir du réseau trans-Golgien vers la membrane plasmique [94, 448], puis empruntent des itinéraires de trafics différents. Lorsque l'APP et BACE1 sont internalisées à partir de la membrane plasmique, elles sont dirigées vers les endosomes précoces, puis l'APP et BACE1 sont séparées et acheminées vers différents organites. La majorité de BACE1 est triée dans des endosomes de recyclage pour un retour à la membrane plasmique, tandis que l'APP est triée dans les lysosomes pour y être dégradée. Ainsi, une perturbation de la régulation du trafic de BACE1 et d'APP peut conduire à un déséquilibre, entraînant une production accrue d'A $\beta$  [73, 94, 369].

Comme dit précédemment, BIN1 est largement distribuée dans les endosomes précoces et tardifs, les lysosomes et les endosomes de recyclage [1, 276, 321]. Les études tendent à montrer que la diminution de l'isoforme cérébrale de BIN1 dans les neurones, entraîne une accumulation anormale de BACE1 dans les endosomes précoces, indiquant que BIN1 participe au processus de genèse de l'A $\beta$  à travers une action sur l'activité protéolytique de BACE1 en intervenant sur son transport vers les endosomes [166, 310, 458]. En revanche, la façon dont BIN1 entraîne l'accumulation de BACE1 dans les endosomes précoces n'est pas encore claire. D'un côté, une étude a montré que la délétion de BIN1 engendre une augmentation des niveaux totaux de BACE1, suggérant un rôle de BIN1 dans la dégradation de BACE1 [310], tandis que d'un autre côté, une étude similaire a montré que la dérégulation de BIN1 aurait pour effet d'affecter le recyclage de BACE1 [458]. De plus, les données indiquent que l'accumulation de BACE1 induite par BIN1 entraîne une augmentation de la genèse d'A $\beta$  malgré des discordances quant à l'augmentation ou la diminution de certaines espèces d'A $\beta$ . Effectivement, certains chercheurs rapportent une augmentation de l'A $\beta$ 42 et de l'A $\beta$ 40 [310] alors que d'autres rapportent une augmentation de l'A $\beta$ 42 et une diminution de l'A $\beta$ 40 [458]. De façon similaire à l'étude de Ubelmann et al., il a été montré que deux variants codants de BIN1 associés aux LOAD [431, 457], augmentaient les niveaux d'A $\beta$ 42 et diminuaient ceux d'A $\beta$ 40 [351]. Toutefois, il convient d'émettre des réserves quant à ces résultats car ces 2 variants n'ont pas été répliqués dans la dernière étude de séquençages d'exomes entiers de la MA [196]. Malgré tout, il semble, en définitive, que la dérégulation de BIN1 aboutit à une augmentation de l'A $\beta$ .

Toutefois, la façon dont BIN1 interfère avec la production d'A $\beta$  *in vivo* semble être différente puisque le rôle de BIN1 dans le tri endosomal n'a pas pu être reproduit *in vivo*. En l'occurrence, des souris portant un seul allèle perte de fonction de BIN1 n'ont montré aucune altération de leurs niveaux ou de la localisation de BACE1 et les niveaux d'A $\beta$  sont restés inchangés [1, 13]. De plus, il a été montré que BIN1 devenait insoluble et les dépôts générés s'accumulaient de façon aberrante autour des plaques séniles à la fois dans des modèles transgéniques pour la MA et dans les cerveaux post-mortem de patients atteints de la MA [13]. De plus, chez la Drosophile, la délétion de l'amphiphysine, dAmph (orthologue de BIN1 chez la Drosophile), n'était pas capable de moduler le phénotype d'œil rugueux induit par l'A $\beta$ 42. Les résultats mentionnés ci-dessus indiquent que BIN1 pourrait ne pas réguler la production d'A $\beta$  *in vivo*. Plus important encore, l'effet de BIN1 sur la génération d'A $\beta$  *in vivo* pourrait être différent de sa fonction largement acceptée dans le tri endosomal.

### *iv. BIN1 et Tauopathie*

A la suite de son identification grâce aux GWAS, des études ont cherché à déterminer les mécanismes possibles par lesquels BIN1 est impliqué dans la pathogenèse de la MA. Il a été montré que BIN1 pourrait affecter le risque de SAD en modulant la pathologie Tau. Effectivement, la délétion de dAmph supprime le phénotype d'œil rugueux chez la Drosophile exprimant Tau et les défauts morphologiques des corps pédonculés (équivalent



fonctionnel de l'hippocampe chez l'homme) provenant de la toxicité induite par Tau [70]. De plus, il a été montré que BIN1 et Tau colocalisent et interagissent en culture cellulaire et dans le cerveau de souris.

En outre, la surexpression de l'isoforme 1 de BIN1 dans un modèle murin de MA induit par Tau a aggravé l'altération de la mémoire à court terme et à l'inverse, a prévenu les défauts de la mémoire à long terme habituellement observés dans ce modèle [400]. La surexpression de BIN1 a également permis de prévenir la formation anormale d'inclusions de Tau dans l'hippocampe, sans affecter les niveaux de phosphorylation de Tau [400].

Une autre étude a montré que, dans un modèle murin de tauopathie, la perte de BIN1 dans les neurones excitateurs et les oligodendrocytes permettait d'atténuer la pathologie Tau dans l'hippocampe, ce qui est reflété par la réduction de l'atrophie ventriculaire et corticale et la relative préservation de la taille des endosomes précoces, ainsi que la gliose et la neuroinflammation, caractéristiques du modèle. En revanche, la perte de BIN1 a exacerbé la pathologie Tau dans certaines régions corticales et dans la moelle épinière, avec une augmentation de la phosphorylation de Tau et la présence de formes insolubles, plus propices à s'agréger, contribuant à aggraver les défauts locomoteurs induits par Tau. En outre, les neurones de certaines régions cérébrales ont également été protégés de la dégénérescence et les synapses n'ont pas été atteintes [358].

Au global, il semble que l'interaction BIN1-Tau puisse prévenir la pathologie Tau et ainsi empêcher les déficits de mémoire à long terme. Toutefois, les résultats des diverses études sont (partiellement) contradictoires, de fait, il n'est toujours pas clair si la modulation de l'interaction entre BIN1 et Tau peut réguler la neurotoxicité de Tau in vivo.

Au cours des dernières années, il a été constaté que l'expression de BIN1 était liée aux mesures cliniques des marqueurs neuropathologiques de la pathologie de la MA telles que la charge de Tau détectée en TEP Tau [132, 133, 232, 470]. En particulier, il a été observé, comme dit précédemment, que certains variants de BIN1 sont associés à une accumulation accrue et rapide de Tau dans le cerveau de patients MA atteints de troubles cognitifs légers ou modérés. [70, 131, 133]. Au contraire, certaines études n'ont pas observé de lien entre BIN1 et Tau dans le cerveau de patients souffrant de la MA [2, 388].

Pour expliquer cette association entre BIN1 et Tau dans les mesures cliniques, des études in vitro ont montré que le domaine SH3 de BIN1 pouvait se lier au domaine PRD de Tau, suggérant qu'une altération de l'interaction entre BIN1 et Tau pourrait moduler le risque de développer la MA [13, 70]. Des études menées sur des cultures primaires de neurones de rats néonataux ont montré que la phosphorylation de Tau en Thr231 entraînait une diminution de son association avec Tau et que les complexes BIN1-Tau pouvaient colocaliser avec l'actine, suggérant que les complexes pourraient perturber l'interaction entre actine et microtubules dans les neurones, causant potentiellement des effets toxiques au cours de la pathogenèse de la MA [291, 426]. En revanche, la phosphorylation de BIN1 en T348 (résidu situé dans les domaines CLAP PRD de BIN1iso1) a été associée à une interaction accrue entre SH3 et Tau. Effectivement, ce site de phosphorylation de BIN1 permet d'abolir l'interaction intramoléculaire entre le motif riche en proline du domaine CLAP et le domaine SH3, libérant ce dernier et facilitant l'accès à des partenaires d'interaction tels que Tau [400].

De surcroît, de plus en plus d'études semblent montrer que Tau pourrait se propager dans le cerveau au cours de la pathogenèse de la MA bien que la façon par laquelle Tau y parvienne n'est pas encore connue [15]. D'un côté, les exosomes pourraient être impliqués dans la propagation de la Tau. A ce sujet, il a été montré que des exosomes contenant Tau, isolés à partir de liquide cébrospinal humain ou dans des modèles neuronaux de tauopathie, pouvaient être transférés de neurone en neurone via les synapses et induire l'agrégation de Tau des cellules les recevant. Par conséquent, l'hypothèse des exosomes a été décrite comme étant la transmission d'exosomes contenant Tau entre neurones, entraînant la propagation de la pathologie Tau et finalement la neurodégénérescence [90, 473].

D'un autre côté, l'isoforme neuronal de BIN1 possède un domaine CLAP, impliqué dans l'EMC [370, 422, 473], pouvant ainsi potentiellement participer à la propagation de Tau. En outre, il a été montré que l'expression de BIN1iso1 était inversement corrélée à la propagation de la pathologie de la Tau en culture neuronale [60]. Dans

ce contexte, une expression plus faible de l'isoforme neuronale de BIN1 pourrait fortement activer Rab5 (un régulateur des endosomes précoces) et augmenter le flux endocytique, favorisant ainsi la propagation de Tau [60]. Une autre étude, au contraire, a montré que l'isoforme ubiquitaire de BIN1, à la différence de l'isoforme neuronale, favorisait la progression de la pathologie Tau en altérant l'élimination de de Tau et en augmentant ainsi la libération d'exosomes enrichis en Tau [90]. En conclusion, il semble que BIN1 puisse influencer le processus de propagation de la Tau, mais sa fonction particulière dans ce processus nécessite d'être approfondie.

### 3- *Drosophila Melanogaster*

#### 1. Principes généraux de l'organisme modèle de la Drosophile

Au cours du siècle dernier, la Drosophile, également appelée mouche des fruits, a été utilisée comme organisme modèle de choix en biologie [16, 24, 28]. L'utilisation systématique de la mouche en tant qu'outil essentiel de la génétique classique a commencé grâce à la découverte fortuite de la mutation blanche lors d'expériences d'élevages de masse, ainsi que la reconnaissance de son lien avec le chromosome X par TH Morgan [172, 314]. Cette découverte a été alimentée par les travaux de ses étudiants, Sturtevant et Bridges [248]. À peine trois ans plus tard, la première carte chromosomique avait été publiée [434].

La recherche de la seconde moitié du XXe siècle a progressivement transformé les mouches en un puissant "objet frontière" reliant la génétique à d'autres disciplines biologiques connexes [233]. Au cours des cinquante dernières années, la génétique des mouches a été systématiquement appliquée avec succès pour décoder les mécanismes clés à la base de nombreux processus biologiques fondamentaux, tels que le développement [53], la signalisation [57], le cycle cellulaire [272], le fonctionnement, le développement et le comportement du système nerveux [28, 130] et même les aspects moléculaires des maladies humaines [35]. Environ 75% des gènes impliqués dans des maladies humaines ont un orthologue chez la Drosophile [377]. Cette conservation évolutive atteint des niveaux d'organisation plus élevés. En outre, les organes de la mouche et des humains partagent souvent des fonctions fondamentales et des principes d'organisation, offrant ainsi des opportunités pour découvrir des concepts et des mécanismes ayant un fort potentiel d'impact sur les sciences biomédicales [28]. Cela explique pourquoi la Drosophile est à l'origine de sept lauréats du prix Nobel.

Cependant, la Drosophile n'est pas un substitut à l'étude de l'humain. Les questions de recherche à aborder doivent être choisies avec soin et être suffisamment fondamentales pour permettre de comprendre des mécanismes applicables aux contextes mammifères ou humains. Bien que la Drosophile, tout comme son homologue ver *C. elegans*, soient des "objets frontières" de choix, les modèles de vertébrés sont désormais plus propices à la recherche génétique, en particulier après l'avènement des technologies CRISPR/Cas9, puisqu'ils permettent de travailler dans un contexte physiologique plus proche de l'humain à l'instar des cellules souches pluripotentes induites (iPSCs). Malgré cela, l'importance des organismes modèles génétiques d'invertébrés n'a pas diminué, simplement en raison de leur efficacité et de leur développement technologique à grande vitesse, pour offrir des opportunités pour la compréhension fondamentale de la biologie. Ainsi, la Drosophile est souvent utilisée comme « tube à essai » pour cribler et étudier les composantes génétiques des processus ou des voies pertinentes à la maladie étudiée, ou pour démêler leurs mécanismes cellulaires et moléculaires, couvrant ainsi un large éventail de mécanismes pathologiques tels que le cancer, les troubles métaboliques, la neurodégénérescence et même les effets neurotoxicologiques [215, 348, 368, 373, 475].

Compte tenu du degré élevé de conservation évolutive, les travaux sur la Drosophile ont jeté des bases importantes pour la recherche chez les mammifères [28] et la mouche continue de jouer ce rôle. Son importance future est évidente, notamment avec l'identification croissante de gènes impliqués dans les maladies humaines, pour lesquels les principales fonctions biologiques restent encore à élucider.

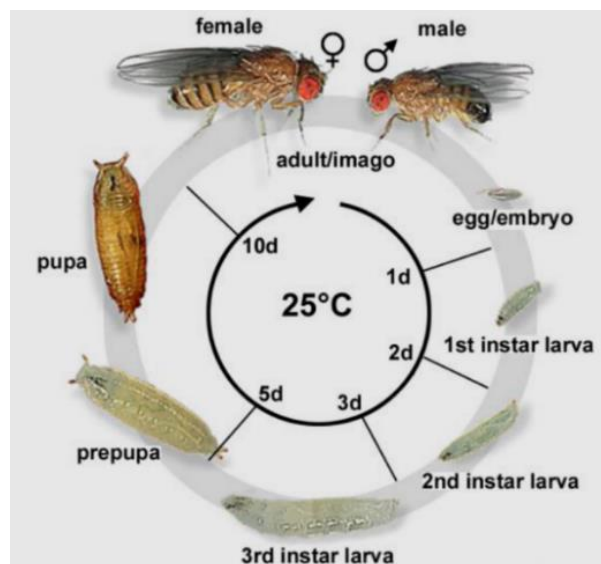
Les progrès de la biologie moléculaire ont apporté des outils et des règles génétiques classiques indispensables pour les recherches sur la Drosophile, tels que le séquençage de son génome, la découverte des éléments transposables pour la transgénèse, les systèmes d'expression génique ciblés, la génération de délétions et d'insertions d'éléments transposables, ainsi que la création de constructions knock-down transgéniques couvrant

pratiquement tous les gènes de la mouche. L'utilisation de recombinases et de nucléases spécifiques à une cible pour l'ingénierie génomique est également devenue une pratique courante [92, 467]. Ces outils permettent aux chercheurs d'explorer en détail les mécanismes moléculaires et cellulaires impliqués dans les processus biologiques, offrant ainsi une meilleure compréhension des mécanismes de la maladie et des voies de signalisation en jeu. Malgré les développements récents dans les techniques de manipulation génétique chez les vertébrés, la *Drosophile* continue d'occuper une place centrale dans la recherche.

Les avantages pratiques les plus importants de la *Drosophile* sont listés ci-dessous :

1- Les *Drosophiles* sont faciles et peu coûteuses à entretenir. Un nombre important de mouches génétiquement différentes peuvent être conservées et stockées dans peu d'espace, comme dans des armoires par exemple, facilitant ainsi les expériences à haut débit et la gestion des stocks.

2- La génération de *Drosophiles* adultes prend environ 10 jours (Figure 15) et peut être raccourcie ou augmentée en fonction de la température d'incubation (cycle de vie plus long à 18°C et plus court à 29°C). Cela permet une progression rapide de la recherche, avec la possibilité de planifier et de surveiller facilement les génotypes sur plusieurs générations.



**Figure 15 : Le cycle de vie de *Drosophila melanogaster*.** Les femelles fécondées stockent les spermatozoïdes dans leur receptaculum seminis en vue de la fécondation de centaines d'œufs qui seront pondus sur plusieurs jours. À 25°C, le développement embryonnaire dure environ 21 heures. Les larves de 1er stade mettent 2 jours à muer en larves de 2ème puis 3ème stade. Les larves de troisième stade continuent à se nourrir pendant un jour de plus (stade de recherche de nourriture) avant de quitter leur source de nourriture et de migrer (stade d'errance) et finalement de se nymphoser (prépupe puis nymphe). Au cours de la nymphose, tous les organes dégèrent (histolyse) et se restructurent pour prendre leur forme adulte (métamorphose). Dix jours après la ponte, les mouches adultes sortent de la loge nymphale. Après l'éclosion, les mâles ont besoin de 8 heures pour atteindre la maturité sexuelle, ce qui peut être mis à profit pour la collecte de femelles vierges. Les durées mentionnées ici doivent être doublées lorsque les mouches sont élevées à 18°C. (Source : [479])

3- Le génome de la *Drosophile* est très peu redondant, contrairement aux humains, ce qui signifie que peu de gènes codent pour les membres d'une classe de protéines, facilitant entre autres, l'analyse de perte de fonction de gènes.

4- Cette très faible redondance et le fait que 75% des gènes impliqués dans des pathologies humaines possèdent des orthologues chez la *Drosophile* sont tout autant d'éléments intéressants pour l'étude du rôle de facteurs de risque génétique dans le contexte de la MA. En l'occurrence, la *Drosophile* possède un orthologue pour l'APP et Tau, respectivement nommés APP-like (APPI) et *Drosophila* Tau (dTau). De surcroit, les composants de la protéolyse de l'APP sont conservés chez la *Drosophile*. Bien que la conservation de la séquence dans la région de l'Aβ42 soit limitée, il a été démontré que l'activité enzymatique neuronale de la BACE1 de *Drosophile* (dBACE) peut conduire au clivage de l'APPI chez la *Drosophile* où le peptide résultant donne lieu à des phénotypes

neurodégénératifs qui s'accompagnent de dépôts A $\beta$ -like [122]. Le clivage de l'APPL donne également lieu aux mêmes types de fragments de clivage que ceux de l'APP humain, y compris de petits fragments CTF intracellulaires liés à la membrane et des peptides neurotoxiques de type A $\beta$ , et il a été démontré que ces derniers sont exprimés dans tout le système nerveux au cours du développement [123].

5- La Drosophile est particulièrement utile pour effectuer des criblages de gènes sans a priori, pour identifier des gènes qui régulent ou interviennent dans des processus biologiques d'intérêt. De plus, les Drosophiles peuvent être utilisées pour tester des médicaments ou les effets toxiques de substances.

6- La manipulation ciblée de pratiquement tous les gènes de la Drosophile est possible, ce qui est idéal pour révéler la fonction d'un gène d'intérêt.

7- Une collection de ressources et d'infrastructures spécifiques aux mouches ont été accumulées, grâce à la collaboration active de la communauté de recherche sur les mouches, facilitant grandement la recherche, notamment grâce à l'existence de bases de données bien organisées et de centres de stockage. FlyBase est le point de référence central pour les chercheurs sur la Drosophile du monde entier [296, 357].

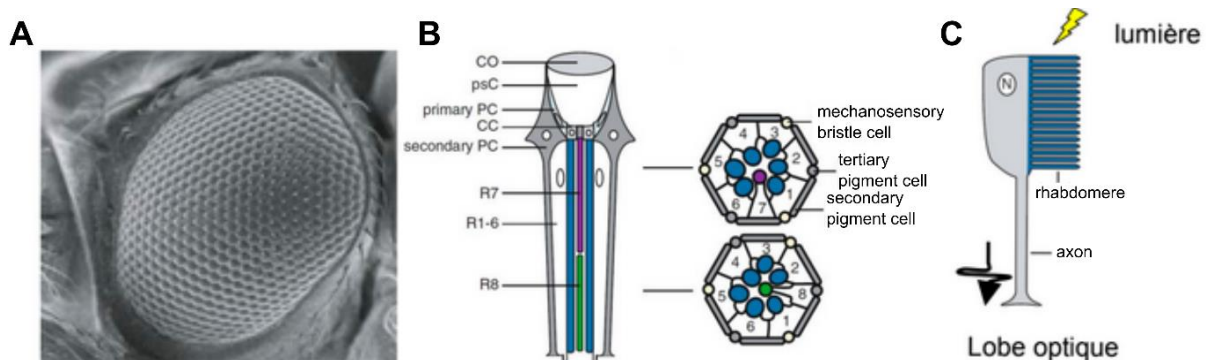
8- Les manipulations expérimentales et les observations de cellules et de tissus *in vivo* sont relativement faciles chez les Drosophiles, car les organes sont d'une complexité et d'une taille relativement faibles.

9- L'anatomie de la mouche est hautement conservée d'un individu à l'autre, en ce qui concerne des caractéristiques telles que la taille et la position des soies, la taille et la forme des yeux, des ailes et des haltères ou encore les motifs des veines des ailes, facilitant l'étude des processus biologiques sous-jacents à la structuration et au développement du corps. De plus, les mutations affectant les marqueurs anatomiques des Drosophiles peuvent être utilisées comme des marqueurs importants lors des croisements génétiques et pour la conception des schémas d'accouplements, permettant de suivre un gène à travers les différentes générations.

A l'égard de l'ensemble des outils disponibles chez la Drosophile, il est aisé de suivre l'héritage d'un gène au travers des différentes générations successives et d'étudier son rôle dans une pathologie comme la MA par exemple.

## 2. Modèle du neurone photorécepteur externe

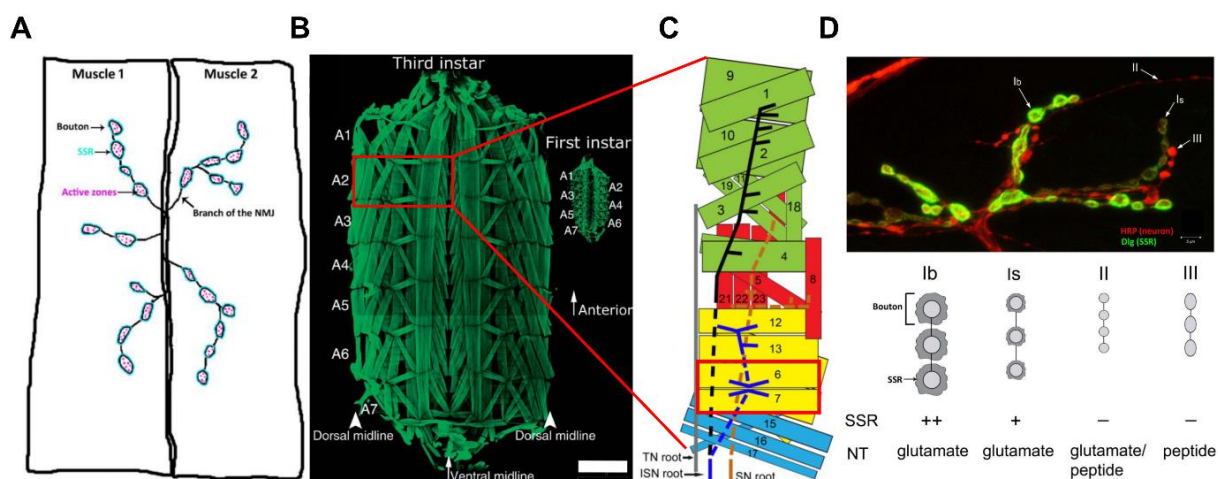
La Drosophile a des yeux à facettes composés d'environ 600–800 unités appelées ommatidies (Figure 16A). Chaque ommatidie possède 8 neurones photorécepteurs : 2 neurones photorécepteurs centraux superposés l'un au-dessus de l'autre et 6 neurones photorécepteurs externes (Figure 16B). Ces neurones photorécepteurs sont dotés d'un compartiment spécialisé appelé rhabdomère, lequel consiste en un empilement microvillaire apical de membranes riches en actine contenant les rhodopsines, des protéines sensibles à la lumière. Ces rhabdomères sont organisés en un trapèze caractéristique qui permet de les compter facilement en microscopie (figure 16C). Ainsi la présence ou l'absence de PRs permet d'évaluer la dégénérescence induite par un gène.



**Figure 16 : Modèle de neurone photorécepteur de l'œil de Drosophile adulte. (A)** La Drosophile a des yeux à facettes qui sont composés d'ommatidies. **(B)** Chaque ommatidie contient 8 neurones photorécepteurs (R1-8). **(C)** La partie photosensible du neurone photorécepteurs est appelée rhabdomère.

### 3. Modèle de la jonction neuromusculaire

Le modèle synaptique de référence chez la *Drosophile* est le modèle de jonction neuromusculaire (JNM) chez la larve 3ème stade de *Drosophile*. Tout comme les synapses excitatrices du système nerveux central chez les mammifères, les JNMs sont des synapses glutamatergiques de grande taille entre un motoneurone et une cellule musculaire (Figure 17A). La paroi musculaire de la larve présente une structure symétrique typique organisée entre 3 segments thoraciques et 8 segments abdominaux (Figure 17B). Chacun de ces segments abdominaux possède la même organisation caractéristique de leurs 23 cellules musculaires. (Figure 17C). Ce haut degré de conservation de la structure musculaire nous permet de travailler systématiquement sur la même JNM dans le même segment abdominal, indépendamment de la larve utilisée. Il est important de noter qu'il existe plusieurs types de boutons synaptiques qui diffèrent soit de par la proportion du réticulum subsynaptique entourant le bouton synaptique soit de par le type de neurotransmetteur (glutamate/peptide) (Figure 17D).



**Figure 17 : Anatomie de la paroi musculaire de larve de *Drosophile* et de l'arrangement neuronal.** (A) Représentation schématique d'une JNM entre un motoneurone et des cellules musculaires. (B) Marquage de la paroi musculaire montrant une larve 3ème stade comparé à une larve 1ère stade montrant une structuration répétée de la musculature dans les 7 segments abdominaux. Échelle 500  $\mu$ m. (C) Représentation schématique de la musculature d'un segment avec son innervation. Présence de 3 racines nerveuses : la racine intersegmentaire (ISN), la racine segmentaire (SN), la racine transverse (TN) et leur modèle d'innervation respectif. (D) Immunofluorescence d'une JNM montrant des boutons synaptiques de type Ib, Is, II et III. (Source : [159, 303])

### 4. Conservation fonctionnelle des isoformes humaines de BIN1 chez la *Drosophile*

Il s'avère que tout comme les sujets humains portant des mutations codantes pour BIN1 et souffrant de myopathie [327], les mouches présentant une délétion de l'amphiphysine de *Drosophile*, dAmph, arborent des défauts locomoteurs, dus à une altération de la morphogenèse des tubules T dans les cellules musculaires [278, 504]. En utilisant un allèle dAmph<sup>M108903-TG4.0</sup>, qui permet l'expression de Gal4 sous le contrôle du promoteur endogène de dAmph tout en arrêtant la transcription de dAmph, il a été montré que l'expression de BIN1iso8 humaine était capable de restaurer les capacités locomotrices des mouches dAmph nulle à des niveaux similaires à ceux observés chez les mouches témoins, indiquant une conservation fonctionnelle de BIN1iso8 humain chez la *Drosophile* [263].

De plus, la surexpression de dAmphA entraîne des défauts de développement des neurones photorécepteurs de la rétine de *Drosophile* [504]. Il a été montré que l'expression individuelle de BIN1iso1, BIN1iso8 ou BIN1iso9 reproduisait un phénotype similaire et que des niveaux élevés de BIN1iso1 et BIN1iso9 exacerbèrent le phénotype, indiquant un effet dose-dépendant [263]. En conclusion, la surexpression de toutes les isoformes de BIN1 humaines sont capables d'imiter le phénotype provoqué par la surexpression de dAmphA pendant le développement des neurones photorécepteurs, suggérant une conservation fonctionnelle également au niveau neuronal.

## 4- Objectifs de la thèse

La MA est une pathologie multifactorielle avec une composante génétique importante. Grâce à l'essor des GWAS et des WES, il a été possible d'identifier 76 loci associés à la MA. Dès lors, il a été nécessaire de valider les gènes identifiés en déterminant leur association avec les processus pathophysiologiques de la MA.

En l'occurrence, plusieurs facteurs de risque de la MA sont impliqués dans le trafic intracellulaire, à l'instar de BIN1, le second facteur de susceptibilité génétique, en termes d'association, après APOE. De façon intéressante, la voie endosome-lysosome est de plus en plus associée à la pathogenèse de la MA, en dépit de l'hypothèse de la cascade amyloïde, qui fait foi dans la recherche sur Alzheimer. En outre, un des premiers marqueurs cytopathologique de la MA est l'élargissement anormale des endosomes précoces. Ainsi, il est pertinent d'étudier les gènes dont les fonctions peuvent expliquer de tels changements morphologiques. BIN1 est impliquée dans une multitude de fonctions biologiques, à savoir, dans des processus membranaires et dans le trafic intracellulaire. Toutefois, la lecture du rôle de BIN1 dans la pathophysiologie de la MA est perturbée par le nombre importants d'isoformes qu'elle possède.

De surcroît, un autre événement survenant précocement dans la MA est la perte synaptique, qui est corrélée au déclin cognitif observé dans la pathologie. De façon notable, le trafic intracellulaire est également essentiel dans la fonction synaptique ou il régit la formation des vésicules présynaptiques et le recyclage des récepteurs membranaires post-synaptiques. De fait, il apparaît clairement que le trafic intracellulaire occupe un rôle central dans la pathogenèse de la MA et qu'il est pertinent d'approfondir nos connaissances sur les facteurs de risque génétique impliqués dans cette voie de signalisation.

Il est important de noter que l'impact des dérégulations de l'expression des différentes isoformes sur le processus pathophysiologique de la MA n'a pas encore été élucidé. Dans ce contexte complexe, il est essentiel d'aborder les fonctions spécifiques des isoformes de BIN1 pour une compréhension globale de son rôle dans la pathophysiologie de la MA. À cette fin, ma thèse s'articule autour de 2 principaux objectifs :

- Le 1er objectif de mon projet de thèse est d'étudier les mécanismes de toxicité neuronale de BIN1iso1 en utilisant le modèle des neurones photorécepteurs.
- Le 2ème objectif de mon projet de thèse est d'étudier l'impact de l'expression de BIN1 et de ses isoformes au niveau synaptique via l'observation morphologique des jonctions neuromusculaires de larve 3ème stade.



# **Matériels Et Méthodes**





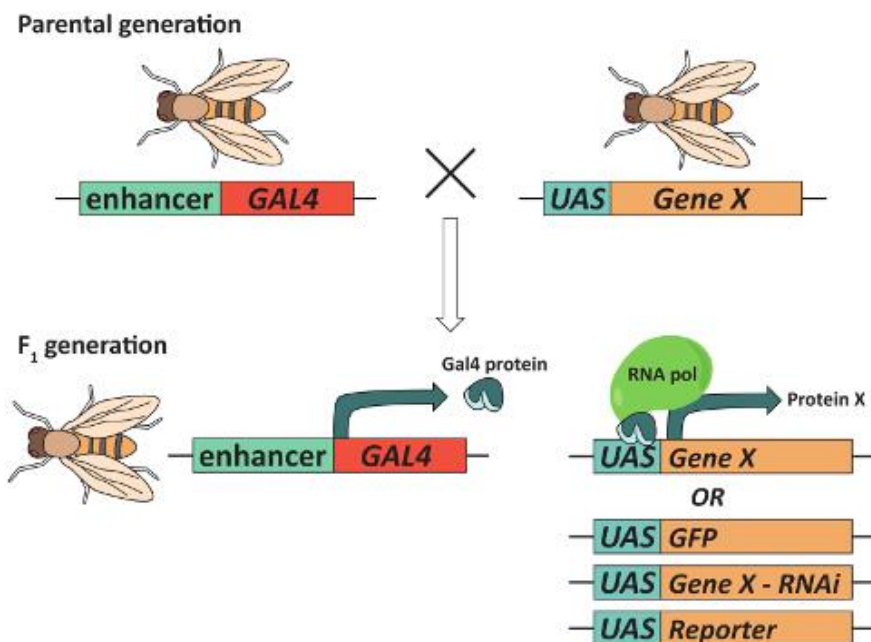
## 1- Lignées des Drosophiles transgéniques et condition d'élevage

Les mouches ont été élevées sur un milieu standard (Nutri-fly BF, Genesee Scientific, San Diego, CA, USA) à 25°C en cycle jour/nuit de 12h/12h.

Un outil très largement employé est le système Gal4/UAS. Le Gal4 est un facteur de transcription issu de levure qui active les gènes se trouvant en aval d'une séquence UAS (Upstream Activating Sequence) (Figure 18). Le Gal4 n'est pas exprimé de manière endogène chez les mouches et n'agit sur aucun locus endogène dans le génome de la Drosophile. Ainsi, des lignées de Drosophiles transgéniques portant cet outil ont été créées de façon à exprimer le transgène soumis à ce système. Cela fournit un système d'expérimentation incroyablement versatile et puissant. Une autre caractéristique importante du système Gal4/UAS est que sa force d'expression peut être diminuée/augmentée en maintenant les individus Gal4/UAS à des températures plus basses (par exemple 18 °C) ou plus élevées (par exemple 29 °C).

Le gène codant pour la protéine Gal4 est sous la dépendance d'un promoteur spécifique permettant au système d'agir dans un tissu précis. Dans notre cas, nous utilisons le promoteur Rhodopsine 1 (Rh1), permettant une expression des transgènes uniquement dans les rhabdomères des neurones photorécepteurs externes (R1-R6) de l'œil de Drosophile. Ce promoteur est actif dans les neurones PRs après la morphogenèse des rhabdomères à la fin du développement pupal.

Les lignées UAS-BIN1iso1, UAS-BIN1iso1 ΔEx7, UAS-BIN1iso1 ΔCLAP, UAS-BIN1iso9, UAS-BIN1iso8 et UAS-dAmphA ont été générées dans le cadre de cette étude. En bref, des ADNc ont été sous-clonés dans un vecteur pUASTattB et injectés dans des lignées attP2 (sur le chromosome III) et attP40 (sur le chromosome II) (BestGene Inc., CA, USA). Les lignées rh1-Gal4, rh1-GFP, UAS-GFP:ninaC, UAS-evi:GFP, UAS-GFP:LC3 ont été décrites précédemment [13, 17, 36, 40]. Les lignées de mutants perte ou gain de fonction et d'ARN interférents ont été obtenues chez le Bloomington Drosophila Stock Center (BDSC, Bloomington, IN, USA). D'autres lignées ont pu être obtenues à la demande auprès de laboratoires possédant des constructions non référencées. Les lignées utilisées sont indexées dans le tableau 1 (Annexe).



**Figure 18 : Système Gal4/UAS.** Système binaire constitué d'une première construction qui exprime le facteur de transcription Gal4 sous le contrôle d'un promoteur spécifique et d'une deuxième construction portant une séquence UAS, sur lequel le Gal4 va venir se fixer, entraînant l'expression du transgène placé en aval. (Source : [234])

## 2- Western Blot des échantillons de Drosophiles

Les têtes de Drosophiles (10 têtes par condition) ont été disséquées et broyées dans 30µL de tampon NuPAGE LDS (NP0008, NuPAGE, Novex, Life Technologies) supplémenté d'un agent réducteur (NP0009, NuPAGE, Novex, Life Technologies). Les échantillons ont été centrifugés (8500g, 10min, 4°C) et le surnageant a été stocké à -80°C. Une fois décongelés, ceux-ci ont été dénaturés par chauffage 10 minutes à 85°C puis déposés et séparés sur gel acrylamide bis-tris 4-12% (NuPAGE, Novex, Life Technologies) dans un tampon MOPS 1X (NP0001-02, NuPAGE, Novex, Life Technologies). Les échantillons ont été transférés sur une membrane de nitrocellulose (NuPAGE, Novex, Life Technologies) en utilisant le kit Biorad Trans-Blot transfert system (Biorad) selon les recommandations techniques du fournisseur (7 min, 2,5A, 25V). La qualité de la migration et du transfert a été vérifiée par coloration avec du rouge Ponceau 0,2% (Sigma).

Les membranes ont été incubées pendant 1h à température ambiante dans du TNT 1X (Tris 0,15M, NaCl 1,5M, Tween20 0,5%) additionné de 5% de poudre de lait écrémé pour bloquer les sites aspécifiques et marquées avec l'anticorps primaire dans un tampon bloquant SuperBlock Tween 20 (37563, Thermo Scientific) sur la nuit à 4°C. Cette incubation est suivie de 3 rinçages de 10 minutes au TNT 1X afin d'éliminer les anticorps s'étant fixés de manière aspécifique. La membrane est ensuite incubée avec l'anticorps secondaire pendant 2h suivi de 3 nouveaux rinçages de 10 minutes au TNT 1X afin d'éliminer l'excès d'anticorps secondaires.

Les anticorps utilisés sont les suivants : anticorps primaire anti-BIN1 (BIN1 99D, 05-449, Abcam, RRID:AB\_309738, 1/2500), anticorps primaire anti- $\alpha$ -tubuline ( $\alpha$ -tubuline DM1A, T9026, Sigma, RRID:AB\_477593, 1/5000), anticorps primaire anti-GFP (anti-GFP, G1544, Sigma, RRID:AB\_439690, 1/4000) et anticorps secondaires conjugués HRP (Jackson ImmunoResearch, anti-mouse 115-035-003, RRID:AB\_10015289 and anti-rabbit 111-035-003, RRID:AB\_2313567, 1/10000).

L'immunoréactivité a été révélée par incubation avec 2mL d'ECL (WBLUC0500, Immobilon Classico Western HRP Substrate, Millipore) pendant 1 minute et observée par chimiluminescence grâce à la caméra Amersham Imager 600 (Gelifesciences, GE Healthcare, États-Unis).

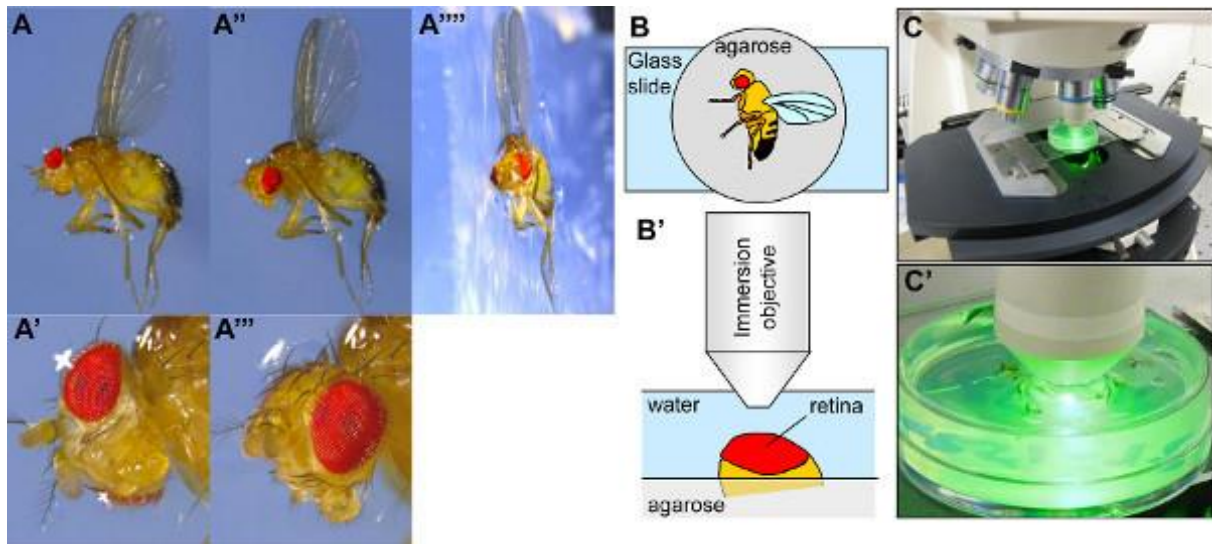
La quantification relative a été réalisée avec le logiciel Fiji et les résultats obtenus ont été normalisés par l'expression de la tubuline.

## 3- Neutralisation de la cornée

Les mouches anesthésiées au CO<sub>2</sub> étaient placées dans des boîtes de Pétri (35mm) remplies à moitié d'agarose 1-1,25% et recouvertes d'eau à 4°C conformément à la technique de neutralisation de la cornée [104, 356] (Figure 19).

Les photos des neurones photorécepteurs des yeux de Drosophile ont été prises à différents points focus, avec un microscope confocal Zeiss 710 (Zeiss, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un objectif à immersion 40X à eau. Les images ont été acquises avec un statif caméra Axio Imager Z2, en utilisant le logiciel d'acquisition Zeiss Zen, de façon à obtenir une série d'images avec des profondeurs de champs qui se chevauchent. Les neurones photorécepteurs ont été quantifiés manuellement.

L'analyse statistique a été réalisée avec le logiciel R. Un test non paramétrique, Wilcoxon, a été utilisé pour déterminer si les différences entre les conditions étaient statistiquement significatives.



**Figure 19 :** Mise en place de la *Drosophile* pour visualisation par neutralisation de la cornée. (A-A''') Photographies d'une *Drosophile* immobilisée sur une boîte de Pétri remplie d'agarose. A''', la *Drosophile* est enfoncée à moitié dans la gélose, avec l'aile droite au sein de l'agarose et l'aile gauche collée à la surface de la gélose. A'' La tête doit donc être réorientée avec une pince de sorte que le milieu de l'œil soit orienté vers le haut. (B-B') Schéma montrant une *Drosophile* immobilisée sur une plaque d'agarose et le positionnement de la *Drosophile* sous l'objectif du microscope. (C-C') Photographies de la fixation de la *Drosophile* à l'étape de la microscopie.

## 4- Dissection des rétines des yeux de *Drosophiles* adultes

Pour disséquer les têtes de mouches, nous avons anesthésié les mouches avec du CO<sub>2</sub> et les avons placées sur le côté. En appuyant doucement sur le thorax de la mouche, nous avons fait sortir la tête et exposé le cou. Nous avons ensuite glissé les pinces le long du cou exposé pour sectionner la tête. Nous avons retiré le proboscis et avons utilisé le trou résultant pour déchirer la cuticule le long du plan sagittal, divisant la tête en deux. Avec les pinces, nous avons retiré le reste du système nerveux central. Ensuite, nous avons enlevé la cuticule entourant la rétine à l'aide d'un scalpel, tout en laissant des petits morceaux de cuticule à la base et au sommet de la rétine pour faciliter la manipulation ultérieure. Nous avons maintenu l'œil fermement avec les pinces en utilisant la cuticule restante, puis avons enlevé (ou non, au choix) doucement la lamina, la zone où les neurones PRs externes projettent leurs axones, à l'aide d'un scalpel, sans endommager la rétine en dessous. Toute la dissection s'effectue dans du tampon phosphate salin (PBS 1X, 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) ou du milieu Schneider (Schneider's *Drosophila* Medium (1X), 21720-024, Gibco) préalablement refroidi à 4°C.

## 5- Immunofluorescence des rétines des yeux de *Drosophiles* adultes

Après dissection, les rétines sont fixées dans une solution de 4% de paraformaldéhyde (PFA 4%) en tampon phosphate salin (PBS 1X) pendant 20 minutes à température ambiante. Après lavage, les rétines ont été finement disséquées, perméabilisées et dépigmentées dans une solution de 0,3% (v/v) de Triton X-100 en PBS 1X (PBT 0,3%) pendant une nuit à 4 °C sous agitation légère. Après blocage avec du sérum normal de chèvre/d'âne à 5% dans du PBT 0,3%, les échantillons ont été incubés sur la nuit à 4 °C avec les anticorps primaires dilués dans du PBT 0,3%. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-sous-unité alpha de la NA/K ATPase (a5, DSHB, RRID:AB\_2166869, 1/100), anti-rhodopsine (4C5, DSHB, RRID:AB\_528451, 1/200) et anti-GFP (132004, Synaptic System, RRID:AB\_11041999, 1/100). Après lavage, les rétines ont été incubées pendant une nuit à 4 °C avec la phalloïdine (anti-F-actine Alexa 555, A34055, ThermoFisher Scientific) et les anticorps secondaires dilués dans du PBT 0,3% : Alexa 488 âne anti-cobaye (706-545-148, RRID:AB\_2340472, Jackson ImmunoResearch), Alexa 633 Chèvre anti-souris (A-21052, RRID:AB\_2535719, ThermoFisher Scientific). Après lavage, les échantillons ont été

incubés dans une solution de 90% de glycérol dans du PBS 1X pendant 30 minutes dans l'obscurité avant d'être montés dans la même solution. Les rétines ont été imagées avec un microscope confocal LSM710 (Zeiss, Wetzlar, Allemagne) équipé d'un objectif à huile 40X.

## 6- Microscopie électronique

Les yeux de *Drosophile* ont été disséqués et fixés dans un tampon de cacodylate de sodium à 0,1 M (pH 6,8) contenant 1 % de glutaraldéhyde, 4 % de paraformaldéhyde pendant 30 minutes à température ambiante, puis toute la nuit à 4 °C. Après lavage, les yeux ont été post-fixés à température ambiante dans 1 % d'OsO<sub>4</sub> et 1,5 % de ferricyanure de potassium pendant 1 heure, puis avec 1 % d'acétate d'uranyl pendant 45 minutes, les deux dans de l'eau distillée à température ambiante dans l'obscurité. Après lavage, les yeux ont été déshydratés avec des solutions successives d'éthanol. Les yeux ont été infiltrés avec de la résine époxy (EMbed 812, EMS) et montés dans la résine dans des moules en silicone. La polymérisation a été effectuée à 60 °C pendant 2 jours. Des coupes ultraminesces d'une épaisseur de 70 à 80 nm ont été observées sur une grille enduite de formvar avec un microscope électronique à transmission Hitachi H7500 (Milexia, France) et les images ont été acquises avec une caméra numérique 1 Mpixel d'AMT (Milexia, France).

## 7- Co-immunoprécipitation

Les têtes de *Drosophiles* (10 têtes par condition) ont été disséquées et broyées dans 30µL de tampon de co-immunoprécipitation (HEPES 10mM, NaCl 140 mM, NP-40 0.5%, pH7.4) contenant des inhibiteurs de protéases (complete protease inhibitor Roche 04693124001) et un inhibiteur de phosphatases (PhosSTOP Roche 04906837001). Les échantillons ont été centrifugés (8500g, 10min, 4°C) puis incubés pendant la nuit à 4°C sous agitation lente avec l'anticorps primaire. Le lendemain, la co-immunoprécipitation est réalisée grâce au kit Pierce Protein A/G magnetic beads (Thermo Scientific, 88802) selon les instructions du fournisseur. Les complexes protéines/anticorps formés sont incubés avec 25 µL (0.25 mg/µL) de billes magnétiques A/G, préalablement lavées trois fois avec du tampon de co-immunoprécipitation. Après 5 heures d'incubation à 4°C, les surnageants (flow-through) sont conservés afin de vérifier l'efficacité de l'immunoprécipitation. Les protéines fixées aux billes sont ensuite resuspendues dans le tampon de dépôt (LDS 4X + agent réducteur) puis les billes sont retirées à l'aide d'un portoir magnétique avant d'effectuer un WB.

## 8- Électrophysiologie

Les électrorétinogrammes (ERG) ont été enregistrés chez des mouches adultes de 3 jours immobilisées sur une lame de microscope en verre à l'aide de colle Pritt liquide. Pour les enregistrements, des pipettes en verre (borosilicatées, diamètre extérieur de 1,5 mm; Hilgenberg) ont été remplies de NaCl 3M et placées dans le thorax, en tant que référence et sur l'œil de la mouche, pénétrant légèrement la cornée pour les enregistrements. Les réponses à un stimulus lumineux répétitif (1 s) donné par une diode électroluminescente verte (voir Figs. 1B, 3B) ont été enregistrées à l'aide du logiciel AxoScope 10.5 et analysées à l'aide du logiciel Clampfit 10.5 (Molecular Devices). Les enregistrements ont été amplifiés à l'aide d'un amplificateur Warner DP311 AC/DC (Warner Instruments) et numérisés à l'aide de la minidigi 1A (Molecular Devices). Les traces de données brutes ont été transférées vers Igor Pro 6.36 (Wavemetrics) pour la préparation des figures.

## 9- Dissection des JNM de larves de 3<sup>ème</sup> stade de *Drosophile*

Les larves sont placées sur une boîte de Petri recouverte de sylgard, un silicone bicomposant (Sylgard™ 184 Elastomer Base, Dow), dans une goutte de milieu Schneider (Schneider's *Drosophila* Medium (1X), 21720-024,

Gibco) froid, afin d'empêcher les larves de sécher ainsi que pour les étourdir, ce qui facilite le travail. Les larves sont ensuite épinglées entre les spiracles postérieurs et au niveau de l'appareil pharyngé, la face dorsale vers le haut. Les larves sont alors étirées en longueur. Cela permet de maximiser la quantité de paroi musculaire exposée lors de la section de la larve. A l'aide de ciseaux de dissection, nous réalisons une incision horizontale au niveau de l'épingle positionnée entre les spiracles postérieurs sur la face dorsale. A partir de cette incision, nous plaçons une des lames du ciseau dans cette incision et réalisons une section verticale le long de l'axe dorsal jusqu'à la partie rostrale. A ce niveau, nous réalisons une nouvelle incision horizontale. A ce stade-ci de la dissection, nous déployons la paroi musculaire de part et d'autre de la section verticale afin de dévoiler l'intérieur. Nous retirons ensuite les organes internes. A l'issue de cette étape, nous étirons le filet une dernière fois horizontalement et verticalement.

## 10- Immunofluorescence des JNM de larves de 3ème stade de *Drosophile*

Une fois la dissection achevée, nous remplaçons alors le milieu Schneider par 100  $\mu$ L de solution de fixation PFA 4% dans du PBS 1X, par larve pour 20 minutes. Nous réalisons ensuite 3 lavages de 10 minutes avec du PBS Triton-X100 0.1%. La saturation est réalisée avec du PBT 0,1% NGS 5% pendant 30 minutes et les anticorps primaires sont mis sur la nuit à 4°C dans du PBT 0,1% NGS 5%. Les anticorps suivants ont été utilisés : anti-HRP488 (123-545-021, Jackson ImmunoResearch, RRID:AB\_2338965, 1/400), anti-Disc Large (Dlg 4F3, DSHB, RRID:AD\_528203, 1/250) et anti-BIN1 (ab182562, Abcam, 1/200). Le lendemain, nous réalisons 3 lavages de 10 minutes avec du PBT 0.1%. A la suite de cela, nous incubons les larves avec les anticorps secondaires dans du PBT 0,1% NGS 5%, 2 heures à température ambiante : phalloïdine (anti-F-actine Alexa 555, A34055, ThermoFisher Scientific), Alexa 633 Chèvre anti-souris (A21052, Life Technology, RRID:AB\_2535719) et Dye Light 405 Âne anti-lapin (711-475-152, Jackson ImmunoResearch, RRID:AB\_2340616). Nous réalisons ensuite 3 lavages de 10 minutes avec du PBT 0,1% suivis d'un rinçage avec du glycérol 90% dans du PBS 1X. Les JNMs ont été imagées avec un microscope spinning disk Gataca Systems (Gataca Sysytems, France) équipé d'une tête Yokogawa CSU-W1 (Yokogawa, Japon), d'une caméra Prime95B (Photometrics, Teledyne Technologies Inc., États-Unis) et d'un statif inversé Ti-2 (Nikon, Japon).

## 11- Quantification des paramètres morphologiques des larves de *Drosophiles*

La morphologie synaptique est étroitement liée à l'activité synaptique. Dans la majorité des cas, les défauts synaptiques entraînent une altération de la morphologie synaptique. La JNM, un modèle de référence bien établi de synapses glutamatergiques, a été largement étudiée depuis des années. L'identification de mutations causant des défauts morphologiques a permis de révéler une panoplie de gènes régulant le développement des synapses et leur fonctionnement. Plusieurs de ces gènes ont été identifiés par le biais d'études à grande échelle qui se focalisaient sur des approches qualitatives afin de détecter des anomalies morphologiques de la JNM.

Nous avons ensuite réalisé des analyses quantitatives pour mesurer des paramètres pertinents et objectifs afin de caractériser les différences morphologiques. Bien qu'il y ait une macro dédiée à l'analyse morphométrique des JNMs (Nijhob et al., 2016), le manque de robustesse de cette dernière nous a amené à adopter la méthode manuelle classiquement utilisée. Il s'agit ici, à l'aide du logiciel Fiji, de délimiter un à un chacun des boutons synaptiques (boutons satellite compris si présents) grâce à l'outil « freehand selection », ainsi, chaque bouton est associé avec une « Region Of Interest » (ROI). Nous mesurons grâce à la fonction « Measure » les paramètres désirés, à savoir ici, l'aire de chaque bouton satellite (en  $\mu$ m<sup>2</sup>) de même que leur nombre. Ces valeurs sont analysées statistiquement via le logiciel R.

## 12- Analyses statistiques

Les informations statistiques sont disponibles dans les légendes des figures. Des tests statistiques bilatéraux ont été utilisés. Les tests d'hypothèse ont été effectués avec le test de Kruskal Wallis suivi d'une comparaison de Mann-Whitney. Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide de R 3.6.0 (R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>) et RStudio 1.2.1335. Pour les boxplots, le segment en gras, les charnières inférieures et supérieures représentent respectivement la médiane, le premier quartile et le troisième quartile. La moustache supérieure s'étend de la charnière supérieure à la plus grande valeur située au maximum à  $1,5 \times \text{IQR}$  de la charnière (où IQR est l'écart interquartile, ou la distance entre les premier et troisième quartiles). La moustache inférieure s'étend de la charnière inférieure à la plus petite valeur située au maximum à  $1,5 * \text{IQR}$  de la charnière. Les données sont affichées comme la moyenne  $\pm$  l'écart-type moyen (SEM) ou la déviation standard (SD). Les différences avec une p value  $<0,05$  ont été considérées comme significatives.





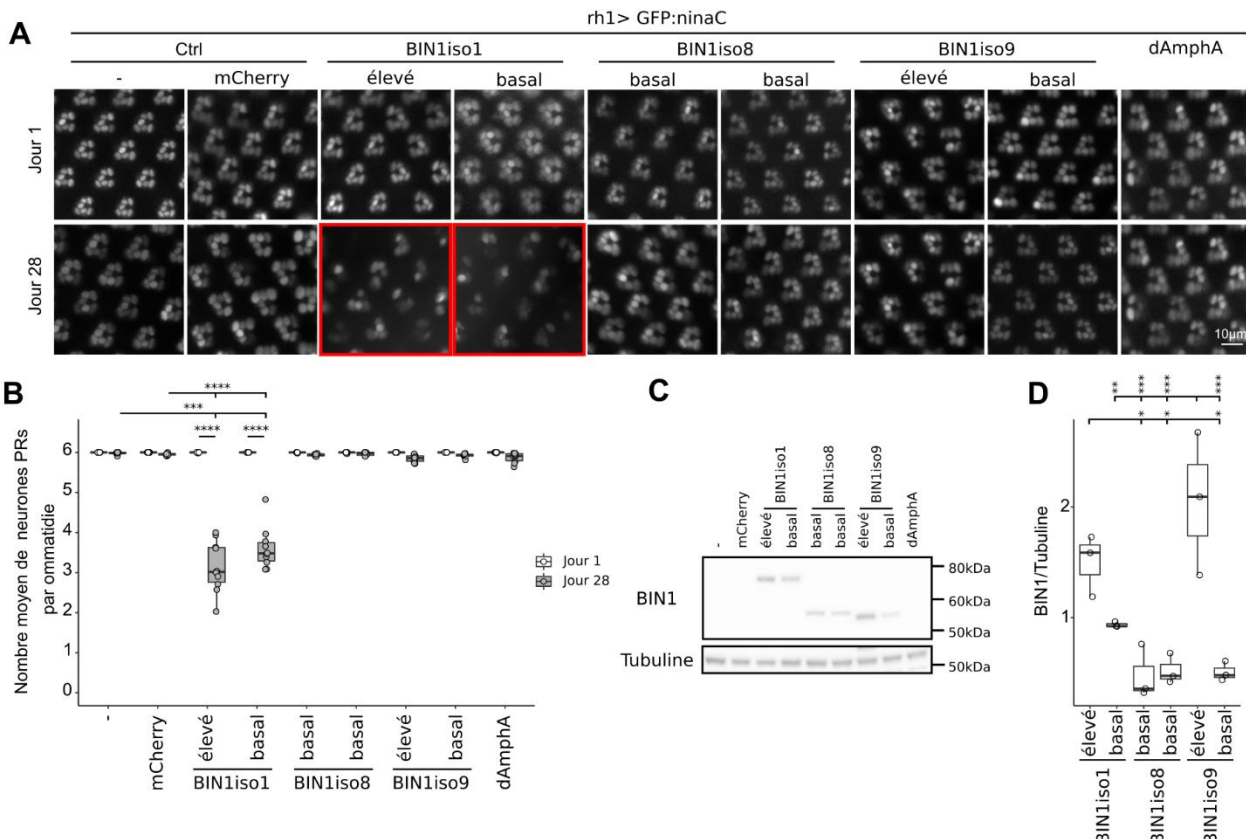
# Résultats



# 1- L'isoforme 1 humaine de BIN1 est neurotoxique pour les neurones photorécepteurs chez la Drosophile

## 1. BIN1iso1 induit spécifiquement la dégénérescence des neurones photorécepteurs

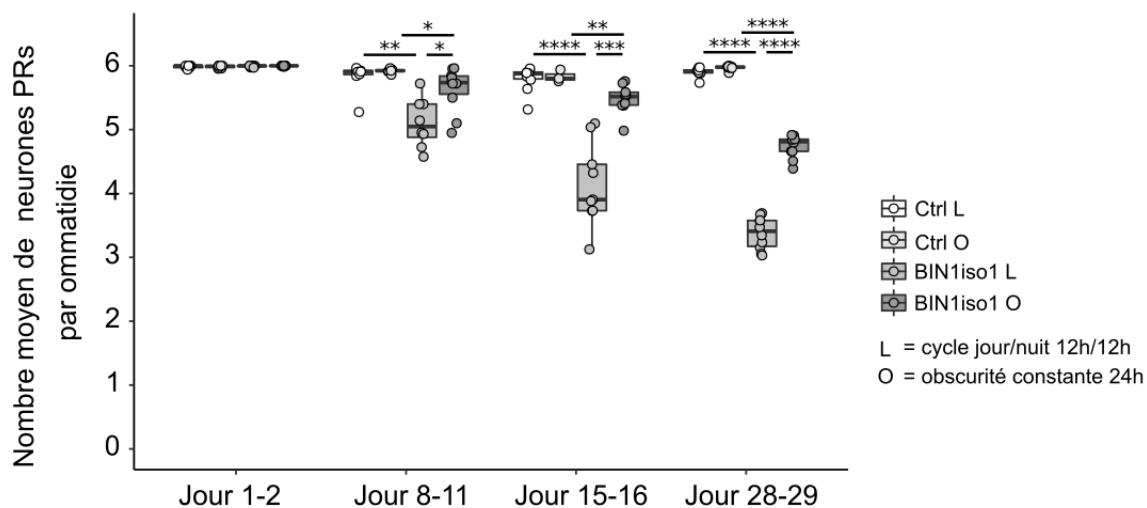
En premier lieu, nous avons cherché à savoir si les isoformes humaines de BIN1 pouvaient être neurotoxiques lorsqu'exprimées à l'âge adulte. Pour ce faire, nous avons utilisé le promoteur Rh1, spécifique des PRs externes, qui est actif dans les neurones PRs après la morphogenèse des rhabdomères à la fin du développement pupal. Nous avons quantifié le nombre de neurones PRs externes grâce à la visualisation des rhabdomères via la technique de neutralisation de la cornée. Nous avons observé que les jeunes mouches (âgées d'un jour) ne montraient pas de changements dans le nombre ou la morphologie des neurones PRs externes (6 par ommatidie) (Figure 20A). Ces observations indiquent que l'utilisation du promoteur Rh1 a permis d'éviter les défauts développementaux observés lorsque BIN1 est exprimé grâce au promoteur GMR, qui permet l'expression du Gal4 lors de la morphogenèse de l'œil de Drosophile [263]. Nous avons alors observé que les mouches âgées de 4 semaines exprimant BIN1iso1 ont perdu environ la moitié de leurs neurones PRs externes, mais pas les mouches exprimant BIN1iso8, BIN1iso9 et dAmphA (Figure 24BCD). Ce phénotype n'était pas dépendant de la dose car les mouches exprimant des niveaux basaux et élevés de BIN1iso1 avaient une perte similaire de neurones PRs externes. En résumé, l'expression de BIN1iso1 induit une dégénérescence progressive des neurones PRs de Drosophiles adultes, isoforme-spécifique et dose-indépendante.



**Figure 20 : BIN1iso1 humaine est neurotoxique dans les neurones photorécepteurs des yeux de Drosophile adulte** (A) Visualisation des neurones photorécepteurs de la rétine exprimant les isoformes de BIN1 (promoteur rh1) par neutralisation de la cornée chez des mouches vivantes. (B) Quantification du nombre de neurones PRs (Kruskal Wallis  $p = 0,013$  suivi d'une comparaison de Mann-Whitney,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ ). (C) Western blot représentatif (D) Quantification de l'expression des isoformes de BIN1 dans la rétine ( $n = 3$ , ANOVA F-value = 12,98, Df = 5,  $p = 0,00017$ , avec post-hoc Tukey,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ).

## 2. La dégénérescence induite par BIN1 est partiellement dépendante de la lumière

Les neurones PRs étant des neurones spécialisés très dépendants de la cascade de phototransduction [472], nous nous sommes demandé si un défaut de cette cascade de phototransduction pouvait être la cause de la dégénérescence neuronale. A cet effet, nous avons évalué si la dégénérescence était dépendante de la lumière. Nous avons fait vieillir des mouches exprimant BIN1iso1 sous un cycle lumière/obscurité normal de 12 h/12 h ou sous obscurité constante pendant 4 semaines. Alors que les mouches soumises à un cycle lumière/obscurité normal présentaient une dégénérescence similaire à ce qui avait été observé précédemment, les mouches sous obscurité constante présentaient tout de même une dégénérescence mais dans une moindre mesure (Figure 21). Cela indique donc que la cascade de phototransduction n'est pas la principale cause de la dégénérescence neuronale mais que l'augmentation de l'activité neuronale favoriserait la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1.

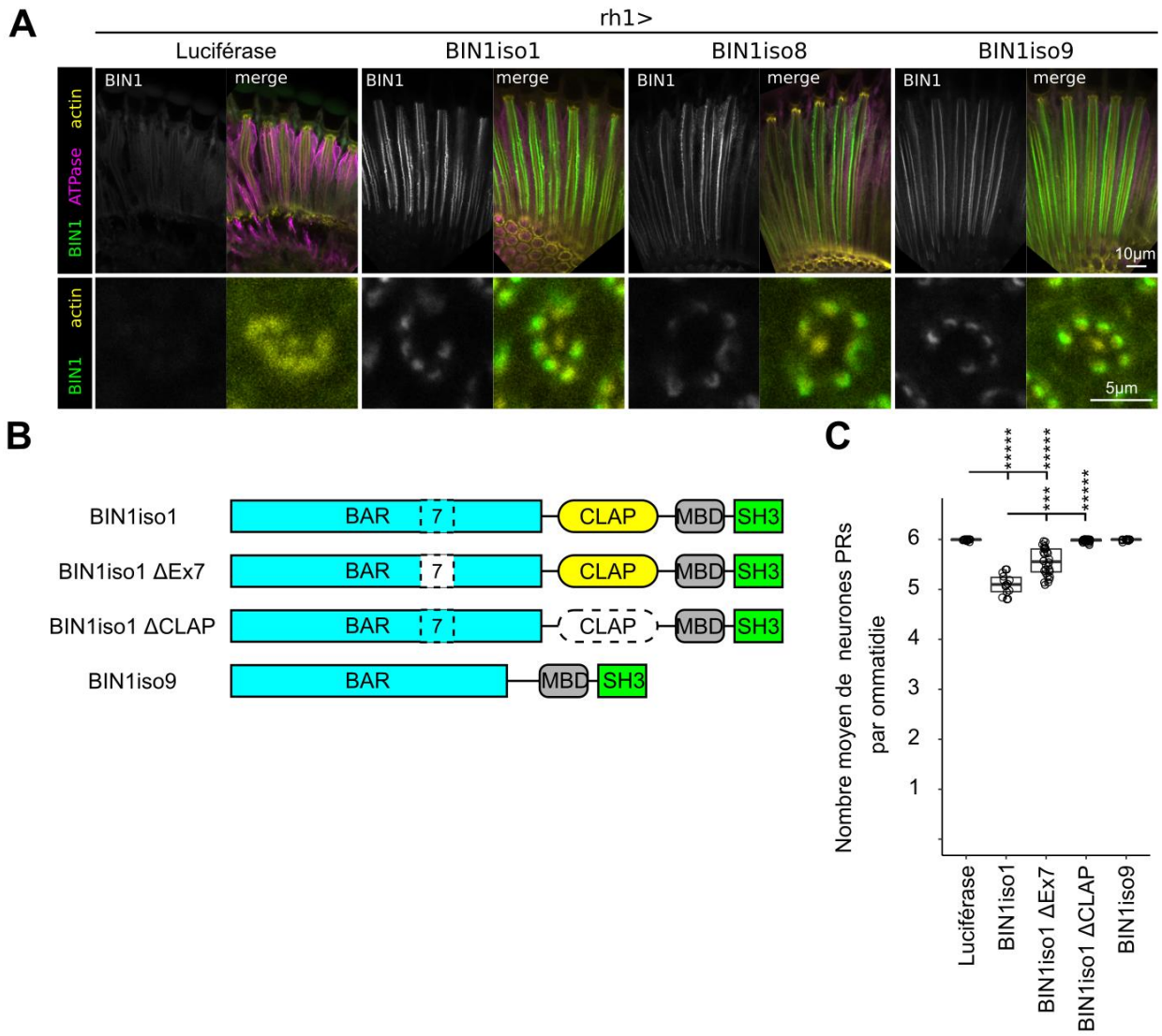


**Figure 21 : La dégénérescence induite par BIN1 est partiellement dépendante de la lumière.** Quantification de la dégénérescence des neurones photorécepteurs induite par BIN1iso1 sur 4 semaines sous un cycle lumière/obscurité de 12 h/12 h (Ctrl L et BIN1iso1 L) ou sous obscurité constante (Ctrl D et BIN1iso1 D) (Kruskal Wallis  $p = 0,0005344$  pour le jour 8-11,  $p = 3,264 \times 10^{-5}$  pour le jour 15-16,  $p = 1,36 \times 10^{-7}$  pour le jour 28-29, suivi d'une comparaison de Mann Whitney,  $*p < 0,05$ ,  $**p < 0,01$ ,  $***p < 0,001$ ,  $****p < 0,0001$ ).

## 3. La toxicité induite par BIN1 est dépendante du domaine CLAP

Pour déterminer la cause de la plus grande toxicité de BINiso1 sur les neurones PRs par rapport aux autres isoformes, nous avons évalué l'effet de la localisation subcellulaire des différentes isoformes de BIN1. Pour ce faire, nous avons marqué les rétines de mouches âgées d'un jour exprimant soit BIN1iso1, soit BIN1iso8, soit BIN1iso9 pour BIN1 (Figure 22A). Nous avons observé que toutes les isoformes de BIN1 étaient enrichies de façon similaire à la base des rhabdomères des neurones PRs (Figure 21A). Nous avons ensuite évalué la possibilité qu'un élément dans la séquence de BIN1iso1 puisse expliquer sa neurotoxicité. Il s'avère que BIN1iso1 diffère de BIN1iso9 par deux séquences : (i) l'exon 7 dans le domaine BAR et (ii) le domaine CLAP spécifique des neurones. Nous avons testé la neurotoxicité des formes tronquées de BIN1iso1 pour ces deux séquences (Figure 22B) après avoir généré les mouches transgéniques correspondantes. Nous avons pu ainsi

observer que la perte du domaine CLAP était suffisante pour abroger la dégénérescence neuronale des neurones PRs externes contrairement à la perte de l'exon 7, qui n'a pu que partiellement empêcher la mort des neurones PRs (Figure 22C). Par conséquent, la dégénérescence induite par BIN1iso1 est dépendante de son domaine CLAP et dans une moindre mesure de l'exon 7 dans le domaine N-BAR. De plus, puisque le domaine CLAP est connu pour interagir avec l'adaptine AP-1, l'adaptine AP-2 et la Clathrin Heavy Chain, qui sont impliquées dans l'endocytose et le trafic intracellulaire [208, 370, 481], ces résultats suggèrent que la cause de la dégénérescence pouvait résulter d'un défaut au niveau de l'endocytose ou du trafic intracellulaire.

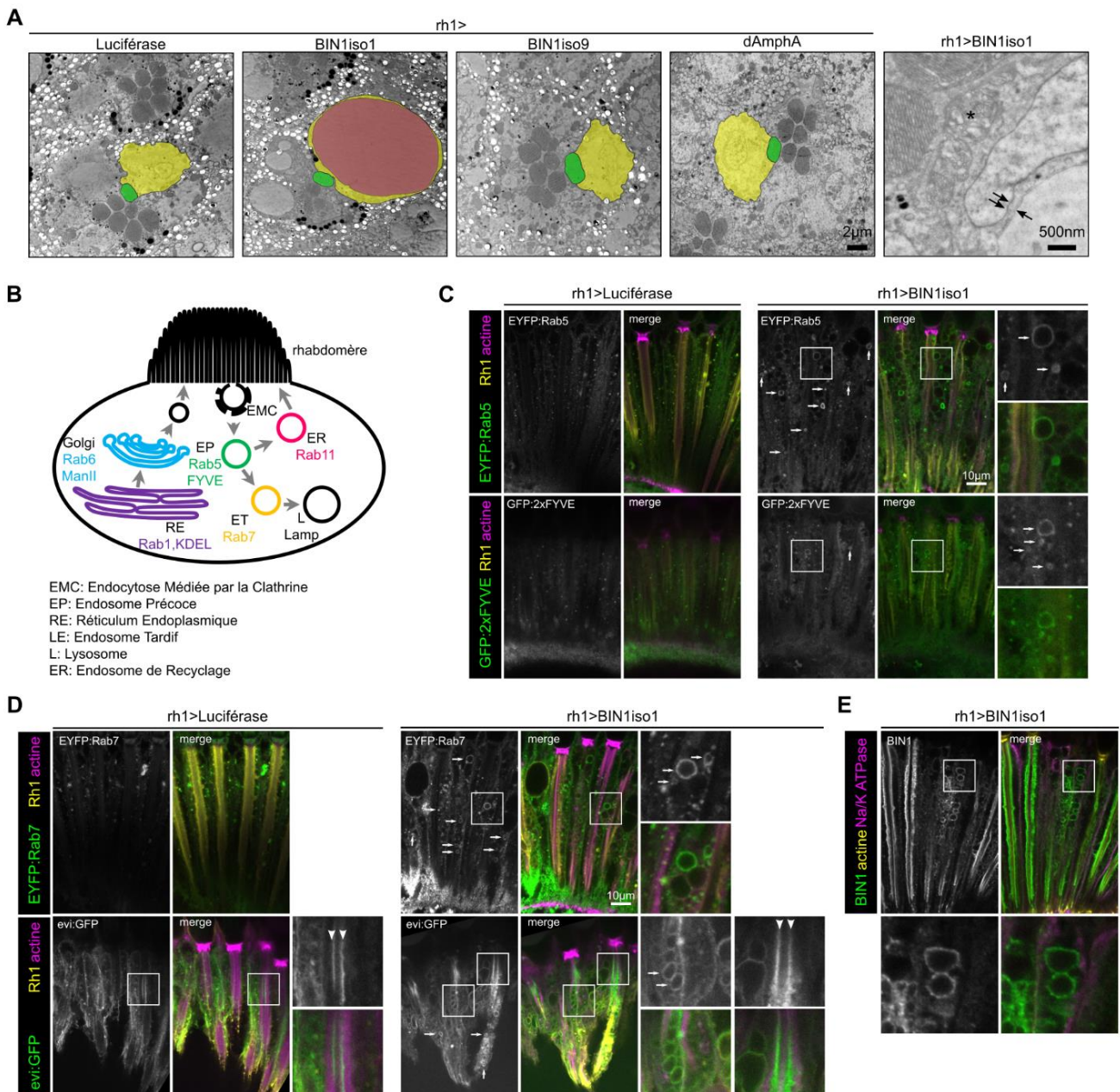


**Figure 22 : Le domaine CLAP est nécessaire à la dégénérescence induite par BIN1.** (A) Localisation des isoformes de BIN1 dans les neurones photorécepteurs de mouches âgées d'un jour. La Luciférase a été utilisée comme contrôle. La coloration de la Na/K ATPase marque la membrane plasmique et la coloration de l'actine marque principalement le rhabdomère des neurones photorécepteurs. Les panneaux supérieurs sont des vues longitudinales de la rétine, tandis que les panneaux inférieurs présentent des vues en coupe de l'ommatidie. (B, C) Schéma des formes tronquées de BIN1iso1 testée et quantification de leur toxicité chez des mouches âgées de 15 jours (Kruskal Wallis  $p = 5,686 \times 10^{-11}$  suivi d'une comparaison de Mann Whitney, \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,00001$ ).

## 2- BIN1iso1 induit une accumulation de vésicules dans les neurones photorécepteurs

### 1. BIN1iso1 induit des anomalies morphologiques dans le corps cellulaire des neurones photorécepteurs

Pour mieux comprendre la cause de la dégénérescence induite par BIN1iso1, nous avons analysé les neurones PRs qui dégénéraient par microscopie électronique. Alors que les neurones PRs de mouches âgées de 15 jours exprimant la Luciférase, BIN1iso9 ou dAmphA n'ont pas montré d'anomalies, les neurones PRs de mouches exprimant BIN1iso1 ont dégénéré davantage en montrant une forte accumulation de vésicules (Figure 23A). Ces vésicules étaient de différentes tailles, certaines d'entre elles étaient presque aussi grosses qu'un ommatidium. Le cytoplasme de certains neurones PRs était rempli de vésicules, compactées contre la membrane plasmique, laquelle semblait par ailleurs intacte. Les vésicules étaient entourées d'une seule membrane et non d'une double membrane comme observé dans le cas des autophagosomes (Figure 23A) et n'avaient pas de contenu spécifique. Les rhabdomères des neurones PRs exprimant BIN1iso1 étaient très largement détruits, tandis que la chromatine semblait normale bien que le noyau ait été fréquemment comprimé entre les vésicules (Figure 23A). Par conséquent, l'analyse ultrastructurale des neurones PRs dégénéralent indique que la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 se caractérise par une forte accumulation de vésicules mono-membranaires d'origine inconnue.





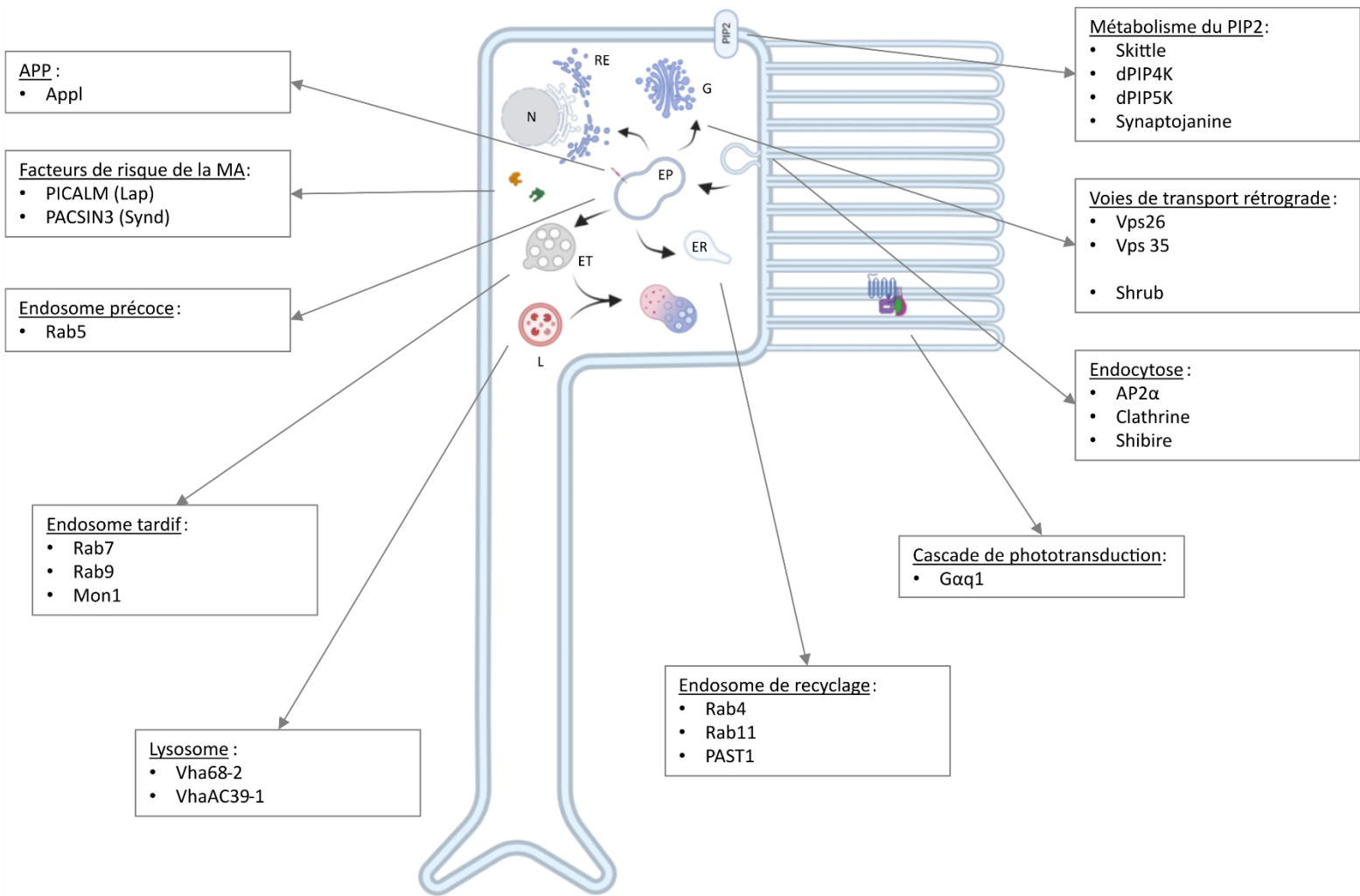
**Figure 23 : La dégénérescence induite par BIN1iso1 est caractérisée par une forte accumulation de vésicules présentant des marqueurs endosomaux.** (A) Images de microscopie électronique de rétines exprimant la Luciférase (Ctrl), AmphA, BIN1iso1 et BIN1iso9 provenant de mouches âgées de 15 jours. 1 à 2 sections transversales d'ommatidies sont visibles sur les 4 images de gauche. Un neurone photorécepteur est représenté par image, son cytoplasme et son noyau étant surlignés en jaune et son rhabdomère en vert. Chaque ommatidium contient 6 neurones photorécepteurs externes dont les rhabdomères sont organisés en forme de trapèze, avec un 7ème rhabdomère au milieu correspondant à l'un des deux neurones photorécepteurs internes. Dans la condition BIN1iso1, seuls 4 rhabdomères sont visibles. De plus, le cytoplasme du photorécepteur est rempli de vésicules, dont certaines (surlignées en magenta) sont très grandes. Ces vésicules sont entourées d'une membrane unique (flèche sur le panneau de droite) par rapport à l'enveloppe nucléaire (double flèche). Leur rhabdomère est généralement en train de se désintégrer (\*). (B) Schéma des organites testés dans les neurones photorécepteurs avec les marqueurs utilisés. (C, D) Images de neurones photorécepteurs exprimant BIN1iso1 et Rab5-EYFP endogène et GFP:2xFYVE, comme marqueurs d'endosomes précoces (C), ou Rab7-EYFP et evi:GFP, comme marqueurs d'endosomes tardifs/corps multivésiculaires (D). La coloration du Rh1 et de l'actine, respectivement en jaune et en magenta dans l'image fusionnée, est utilisée pour marquer la structure de la rétine de mouches âgées de 15 jours. Les neurones photorécepteurs expriment la Luciférase en tant que contrôle ou BIN1iso1. Dans les conditions BIN1iso1, de nombreuses vésicules étaient positives pour les marqueurs d'organites testés (flèches, coloration verte dans les images fusionnées). La coloration extracellulaire inter-rhabdomérique pour le marqueur evi:GFP (tête de flèche) correspond aux exosomes. (E) Images de neurones photorécepteurs exprimant BIN1iso1 colorées pour BIN1, la Na/K ATPase de la membrane plasmique du neurone photorécepteur et l'actine chez des mouches âgées de 7 jours. BIN1iso1 est localisé à la base des rhabdomères et autour de quelques vésicules anormales comme on peut le voir dans l'encadré.

## 2. Évaluation de la nature des vésicules induites par BIN1iso1

Par la suite, nous avons continué avec l'évaluation de la nature de ces vésicules par immunofluorescence en utilisant des marqueurs couplés à la GFP/YFP spécifiques de certains organites, comme pour le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, la membrane plasmique, les endosomes précoces, les endosomes tardifs/les corps multivésiculaires, les endosomes de recyclage, le lysosome et l'autophagosome [110](Figure 23B). Chez les mouches âgées de 15 jours, de nombreuses vésicules induites par BIN1iso1 étaient positives pour EYFP:Rab5 et GFP:2xFYVE, des marqueurs d'endosomes précoces et pour EYFP:Rab7 et evi:GFP, des marqueurs des endosomes/corps multivésiculaires (Figure 23CD). Ces différents indicateurs marquaient des vésicules de petite et moyenne taille, à l'exception de evi:GFP qui tendait à marquer de plus grosses vésicules. A noter que nous avons également remarqué que l'espace extracellulaire entre les rhabdomères des 8 neurones PR au milieu des ommatidies, appelé l'espace interrhabdomérique, était positif pour evi:GFP, à la fois dans les conditions contrôle et BIN1iso1 (Figure 23D). Comme evi:GFP permet de marquer les exosomes soit dans les corps multivésiculaires soit dans l'environnement extracellulaire [23, 269], le marquage evi: GFP dans l'espace interrhabdomérique correspondrait probablement à la libération d'exosomes qui ne semble pas être compromise par l'expression de BIN1iso1. De plus, nous avons observé un marquage pour BIN1 autour de certaines vésicules suggérant une potentielle action directe de BIN1iso1 sur la dynamique membranaire de ces vésicules (Figure 23D). En conclusion, ces résultats suggèrent que l'accumulation de vésicules induites par BIN1iso1 aurait pour origine un blocage au niveau des endosomes précoces et/ou des endosomes tardifs.

## 3- L'expression de régulateurs de la voie endosome-lysosome permet de moduler la toxicité induite par BIN1iso1

Pour déterminer si des défauts du trafic intracellulaire étaient responsables du phénotype de dégénérescence neuronale, nous avons évalué si des régulateurs du trafic intracellulaire pouvaient contrecarrer la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1. A cette fin, nous avons testé des régulateurs de la cascade de phototransduction, de l'endocytose, du métabolisme du PIP2, des endosomes précoces, des endosomes de recyclage, des endosomes tardifs, des corps multivésiculaires, du retromère et du lysosome (Figure 24). Nous avons utilisé une collection de transgènes UAS exprimant des constructions sauvages, mutantes, ARNi, constitutivement actives ou dominantes négatives [506]. De surcroît, nous avons également testé 2 autres facteurs de risque pour la MA, à savoir, PICALM et PACSIN3, qui sont également impliqués dans le trafic intracellulaire. Enfin, nous avons évalué si l'APP pouvait moduler la toxicité induite par BIN1iso1. Dans un second temps, nous avons cherché à identifier des partenaires d'interaction de BIN1 qui pourraient expliquer le mécanisme de toxicité induite par BIN1iso1.



**Figure 24 : Criblage de régulateurs du système endosome-lysosome.** Liste de l'ensemble des gènes testés, ayant des fonctions au niveau de divers organites impliqués dans le trafic intracellulaire.



## 1. Criblage de régulateurs pouvant moduler la dégénérescence induite par BIN1

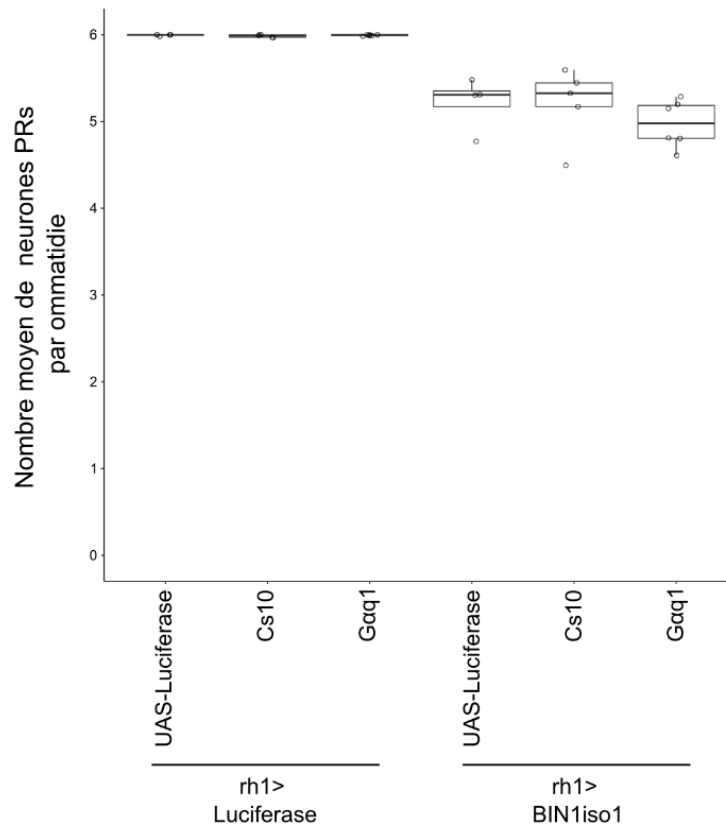
Pour réaliser ce criblage nous avons évalué le nombre de neurones PRs par ommatidie dans les yeux de Drosophiles, comme paramètre de lecture, exprimant divers régulateurs du trafic endosome-lysosome par neutralisation de la cornée. Sur chaque graphique, un point correspond à une mouche pour laquelle nous avons compté le nombre de neurones PRs pour 80-100 ommatidies, donnant ainsi lieu à une moyenne de neurones PRs par ommatidie. Les mouches vieillissaient systématiquement pendant 15 jours dans un incubateur à 25°C (sauf exception ; détails ci-après) dans un cycle jour/nuit 12h/12h (3000lx).

Pour évaluer l'impact d'un régulateur sur la toxicité induite par BIN1iso1, nous avons été amenés à utiliser différents contrôles : les contrôles Luciferase, GFP et Cs10. La nuance entre ces contrôles réside dans le fait que Canton-Special (CS) est l'une des souches sauvages les plus utilisées dans les études de génétique de *Drosophila melanogaster*. La souche CS a été établie par C. B. Bridges et choisie en raison de son faible taux de mutation. S. Benzer a introduit CS dans ce qui allait devenir la neurogénétique dans son étude phare en 1967 [31]. La souche a été utilisée comme contrôle dans les études de neurogénétique depuis lors. Ce contrôle est employé pour comparer les constructions mutantes tandis que le contrôle UAS Luciferase est utilisé pour les constructions de surexpression pour respecter le nombre d'UAS, faute de quoi l'effet observé pourrait découler d'une dilution du facteur de transcription Gal4 entre les séquences UAS. Les contrôles GFP sont utilisés pour les constructions GFP/YFP pour s'assurer que la protéine de fusion n'ait pas d'influence sur la fonction du régulateur testé et n'impacte pas la visualisation des rhabdomères basés sur l'expression d'une GFP.

Pour ce criblage, nous nous sommes focalisés sur les résultats positifs pour lesquels le régulateur testé parvenait à prévenir la dégénérescence des neurones PRs. Effectivement, un effet de sauvetage nous est apparu comme étant plus spécifique qu'une aggravation, pouvant découler d'une multitude de facteurs comme une synergie entre BIN1 et le régulateur testé, un effet compensatoire d'une voie de signalisation ou encore l'implication de plusieurs voies de signalisation. De ce fait, nous avons testé de façon exhaustive de nombreux facteurs et nous avons approfondi les investigations (test de constructions supplémentaires et vérification des niveaux protéiques de BIN1 par Western Blot) lorsqu'un facteur engendrait un sauvetage des neurones PRs afin d'identifier un mécanisme cellulaire.

### *i. Modulation de régulateurs de la cascade de phototransduction*

Bien que nous ayons précédemment montré que la cascade de phototransduction n'était pas la cause principale de la toxicité induite par BIN1iso1, son éventuelle implication, bien que partielle, n'est pas négligeable. Pour cette raison, nous avons voulu évaluer l'impact possible de la modulation de la cascade de phototransduction sur la dégénérescence induite par BIN1iso1. C'est pourquoi, nous nous sommes naturellement intéressés à l'impact de la modulation de la cascade de phototransduction sur la dégénérescence induite par BIN1iso1. Pour ce faire, nous avons sélectionné *Gαq*, un gène codant pour la sous-unité alpha d'une protéine G hétérotrimérique qui fonctionne en aval de la rhodopsine, qui est le récepteur couplé aux protéines G, présent à la surface des rhabdomères, la partie photosensible des neurones PRs. L'hypothèse est qu'en altérant la réception de l'information lumineuse, il pourrait être possible d'impacter la toxicité induite par BIN1iso1. Nous avons ainsi évalué l'impact d'un allèle hypomorphe de *Gαq*, nommé *Gαq[1]*, sur la dégénérescence induite par BIN1. Le mutant n'a pas d'effet par lui-même lorsqu'il est exprimé dans un fond sauvage avec 6 PRs par ommatidie tout comme le contrôle (Figure 25). Lorsque *Gαq1* est exprimé avec BIN1iso1, nous n'avons pas observé de différence significative par rapport à la surexpression de BIN1iso1 seule avec toujours ~5 PRs par ommatidie, suggérant que *Gαq1* ne médie pas à la toxicité induite par BIN1iso1.



**Figure 25 : Impact de la modulation de régulateurs de la cascade de phototransduction sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.** Quantification de la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 lors de la modulation de l'activité du régulateur de la cascade de phototransduction Gcq. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ( $p = 6,317 \times 10^{-6}$ ) suivie d'une comparaison de Mann Whitney (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

## ii. Modulation de régulateurs de l'endocytose

Nous avons pu montrer que le domaine CLAP était nécessaire à la toxicité induite par BIN1iso1 et que l'expression de BIN1iso1 avait engendré une forte vacuolisation des corps cellulaires de neurones PRs. Considérant que le domaine CLAP est un domaine connu pour interagir avec des protéines telles que la clathrine ou AP-2 qui sont impliquées dans l'EMC et qu'il a été montré dans les neurones PRs de Drosophile, qu'un excès de l'EMC pouvait entraîner une augmentation de la taille des endosomes précoces [224], une dérégulation de l'EMC pourrait alors sous-tendre les effets observés. Pour tester cette hypothèse, nous nous sommes notamment intéressés à 3 gènes impliqués dans le processus d'EMC à savoir la clathrine, la protéine adaptatrice AP-2 $\alpha$  et shibire (orthologue de la dynamine) qui participent de façon importante à la formation et à la libération des vésicules endocytiques. Pour plus de précision, AP-2 $\alpha$  est une protéine cargo qui va venir se fixer sur les membranes contenant du PIP2 permettant par la suite à la clathrine de se fixer sur AP-2 $\alpha$  pour former les triskèles de clathrines afin de courber la membrane. Quant à elle, la dynamine intervient à la fin du processus pour libérer la vésicule nouvellement formée dans le cytosol. De façon intéressante, une étude a montré, chez la Drosophile, la perte de fonction de PIP4K (PIP4K<sup>29</sup>), une kinase permettant la formation de PI(4,5)P<sub>2</sub> à partir du PI5P, montraient des défauts du trafic de la rhodopsine 1 (Rh1) associés à des élargissements du compartiment endosomal qui étaient réduits grâce à la diminution de la CME via la suppression de shibire ou la réduction de l'AP2 $\alpha$  ainsi que de la clathrine [224]. En prenant comme point de départ cette étude réalisée par Kamalesh et al., nous avons évalué l'impact d'un mutant dominant négatif pour la clathrine (ClathrinHC<sup>DN</sup>), d'une invalidation d'AP2 $\alpha$  (AP-2 $\alpha$ <sup>HMS00653</sup>) et d'une invalidation de shibire (Shi<sup>HMS00154</sup>) sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.

D'un côté, aucun effet de la réduction d'AP-2 $\alpha$  et de shibire par ARNi n'est observable sur la toxicité induite par BIN1iso1 (Figure 26A). D'un autre côté, l'utilisation d'un dominant-négatif de la clathrine a engendré une

aggravation de la dégénérescence neuronale avec 4 PRs par ommatidie contre 5 PRs pour BIN1iso1 seule (Figure 26A). Ces résultats suggèrent qu'un blocage de la CME ne prévient pas la dégénérescence induite par BIN1iso1.

Pour comprendre le manque d'effet de l'inactivation de shibire, nous avons évalué l'impact des constructions thermosensibles (UAS-Shibire<sup>ts1</sup>;UAS-Shibire<sup>ts1</sup> et UAS-shi<sup>ts1</sup>) sur la dégénérescence induite par BIN1. Ces mutants présentent une fonction altérée au-delà de 29°C.

Dans un premier temps, les croisements étaient effectués à 18°C suivis d'une période de vieillissement à 18°C de 7-8 jours, 15-16 jours ou 20-21 jours, pour contrôler le bon fonctionnement des constructions thermosensibles. Étonnamment, la surexpression seule des mutants shibire en condition contrôle était déjà toxique à 7-8 jours avec 5,5 PRs par ommatidie et encore davantage à 15-16 jours avec 5 PRs par ommatidie (Figure 26B). De plus, le contrôle BIN1iso1 ne présentait aucune dégénérescence avec 6 PRs par ommatidie. Or, la surexpression de BIN1iso1 est toxique dès 7 jours avec 5,5 PRs par ommatidie et davantage encore à 15 jours avec 5 PRs par ommatidie lorsque les mouches vieillissent à 25°C.

C'est pourquoi nous avons effectué un vieillissement de 21 jours. Curieusement, les mouches BIN1iso1 ne présentaient toujours aucune dégénérescence avec 6 PRs par ommatidie (Figure 26B). Toutefois, nous avons observé une toxicité accrue des mutants shibire dans les conditions BIN1iso1, avec 4 PRs par ommatidie, suggérant une possible synergie avec BIN1iso1. L'hypothèse étant que la surexpression de shibire potentialiserait l'endocytose, aggravant le phénotype induit par BIN1iso1 et augmentant la mort des neurones.

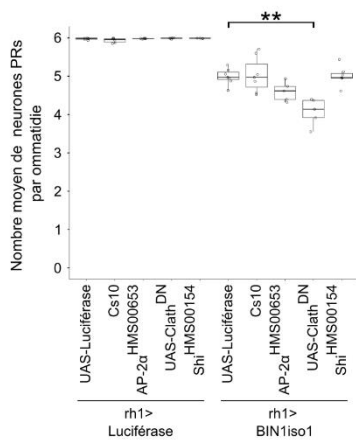
Étant donné que la température d'élevage des Drosophiles influe sur leur cycle de vie mais aussi sur l'efficacité du système Gal4/UAS (plus la température est basse, moins le système est efficace), il est possible que le vieillissement à 18°C ait retardé la survenue de la toxicité induite par BIN1iso1. Nous avons alors vérifié par Western Blot que les mouches exprimaient convenablement l'isoforme 1 de BIN1 (Figure 26C). Les mouches BIN1iso1 présentaient un niveau d'expression similaire à la lignée de référence Rh1-Gal4;UAS BIN1iso1, élevée à 25°C, ce qui exclut la possibilité d'une dilution du Gal4 entre les constructions UAS ou d'une baisse d'efficacité du système Gal4/UAS à 18°C, qui aurait pour conséquence une diminution de l'expression de BIN1iso1, expliquant l'absence de toxicité.

Dans un second temps, nous avons testé les mutants thermosensibles à température restrictive (29°C), température à laquelle la fonction physiologique de shibire est altérée. Nous avons observé que, comme pour l'expérience de vieillissement à 18°C, la surexpression seule des mutants shibire en condition contrôle était déjà toxique avec 5 PRs par ommatidie (Figure 26D). Cette fois ci, nous avons observé une forte toxicité de BIN1 avec 4,5 PRs par ommatidie. Toutefois la surexpression de shibire n'a pas aggravé ni prévenue la dégénérescence induite par BIN1iso1 comme pour les manipulations à 18°C, ce qui peut s'expliquer par le fait qu'à température restrictive, shibire devient non fonctionnel et ne potentialiserait plus l'endocytose, amenant à la perte de synergie de BIN1iso1 et shibire.

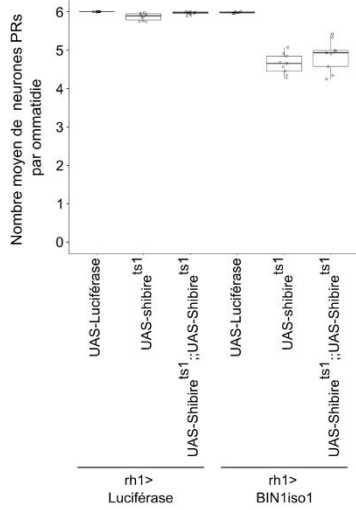
Les résultats étant complexes à interpréter et en tenant compte que la surexpression exogène de shibire puisse potentiellement compromettre les fonctions physiologiques de shibire endogène, nous avons voulu tester 2 autres constructions thermosensibles qui impactent shibire endogène, shi[1] et shi[2]. Pour ces conditions, les croisements étaient effectués à 18°C suivis d'une période de vieillissement à 18°C de 7-8 jours et 15-16 jours. Une fois de plus, les mouches exprimant BIN1iso1 seule n'ont curieusement pas montré de dégénérescence à 7-8 jours avec 6 PRs par ommatidie, toutefois la toxicité est survenue de nouveau à 15-16 avec ~4,5 PRs par ommatidie (Figure 26E). Bien que l'analyse statistique n'ait pas révélé de significativité, nous avons pu remarquer une tendance vers un sauvetage des neurones PRs pour shi[2] laissant sous-entendre une implication complexe de l'endocytose dans la toxicité induite par BIN1iso1.

Dans l'ensemble, les résultats étant difficilement compréhensibles, nous avons eu des difficultés à extraire des informations intelligibles des mutants shibire thermosensibles. Des expériences avec les inactivations de shibire et le dominant-négatif de la clathrine, nous n'avons pas pu conclure que l'inhibition de l'endocytose permettait d'inhiber la dégénérescence induite par BIN1iso1.

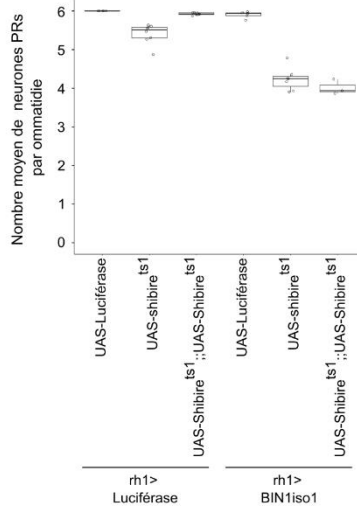
**A** Croisement 25°C - Vieillessement 25°C  
Jour 15-16



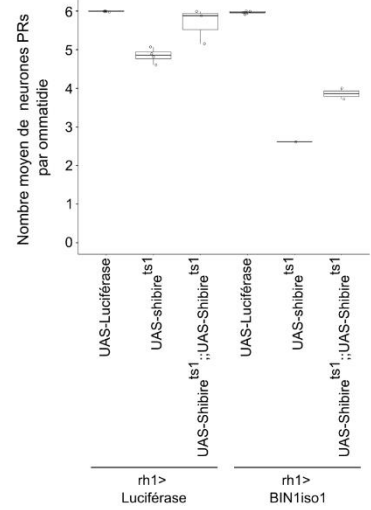
**B** Croisement 18°C - Vieillessement 18°C  
Jour 7-8



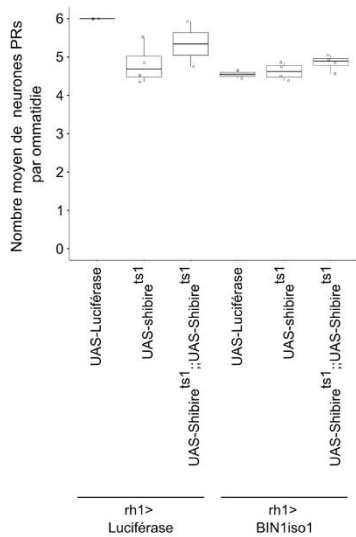
Croisement 18°C - Vieillessement 18°C  
Jour 15-16



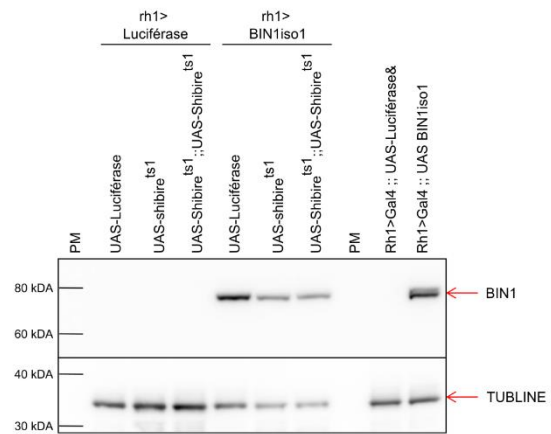
Croisement 18°C - Vieillessement 18°C  
Jour 20-21



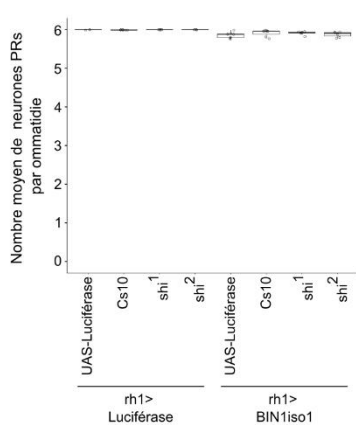
**C** Croisement 18°C - Vieillessement 29°C  
Jour 7-8



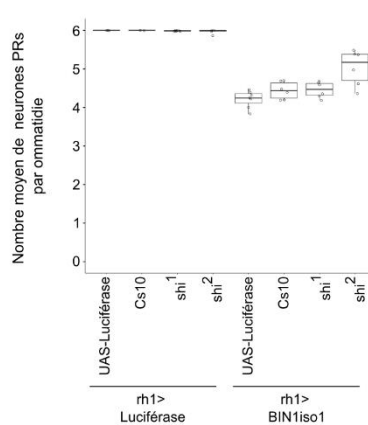
**D**



**E** Croisement 18°C - Vieillessement 29°C  
Jour 7-8



Croisement 18°C - Vieillessement 29°C  
Jour 15-16



**Figure 26 : Impact de la modulation de régulateurs de l'endocytose sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.** Quantification de la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 lors de la modulation de l'activité des régulateurs de l'endocytose AP-2 $\alpha$ , Clathrine et Shibire **(A)**, des constructions thermosensibles chez des mouches élevées à 18°C (croisement à 18°C, périodes de vieillissement : 7-8 jours ; 15-16 jours ; 20-21 jours) **(B)**, des constructions thermosensibles chez des mouches élevées à 29°C (croisement à 18°C, période de vieillissement : 7-8 jours) **(C)**, des constructions Shi<sup>1</sup> et Shi<sup>2</sup> chez des mouches élevées à 29°C (périodes de vieillissement : 7-8 jours ; 15-16 jours) **(E)**. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ( $p= 4,926 \times 10^{-3}$  pour AP-2 $\alpha$ , Clathrine et le mutant Shibire,  $p= 7,599 \times 10^{-3}$  pour les mutants thermosensibles shibire âgés de 7-8 jours et élevés à 18°C,  $p= 1,072 \times 10^{-5}$  pour les mutants thermosensibles shibire âgés de 15-16 jours et élevés à 18°C,  $p= 6,829 \times 10^{-3}$  pour les mutants thermosensibles shibire âgés de 20-21 jours et élevés à 18°C,  $p= 1,012 \times 10^{-7}$  pour les mutants thermosensibles shibire âgés de 7-8 jours et élevés à 29°C,  $p= 5,647 \times 10^{-7}$  pour les mutants thermosensibles Shi<sup>1</sup> et Shi<sup>2</sup> âgés de 7-8 jours et élevés à 18°C,  $p= 9,545 \times 10^{-7}$  pour les mutants thermosensibles Shi<sup>1</sup> et Shi<sup>2</sup> âgés de 15-16 jours et élevés à 18°C) suivie d'une comparaison de Mann Whitney (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). **(D)** Vérification de l'expression de BIN1iso1 chez les constructions thermosensibles dans des mouches élevées à 18°C et âgées de 15-16j.

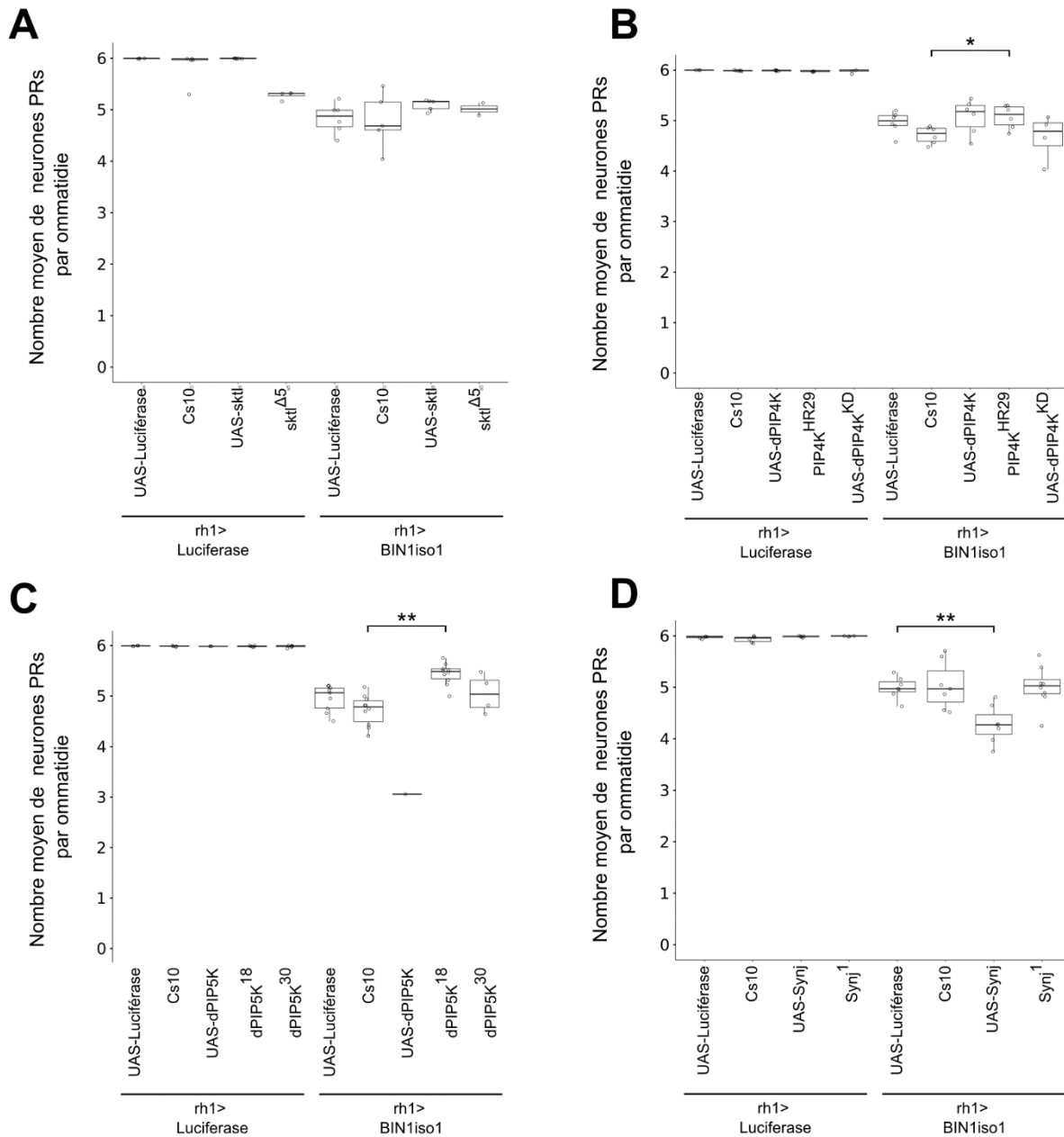
### iii. Modulation de régulateurs du métabolisme du PIP2

Le métabolisme du PIP2 est important pour le trafic vésiculaire. Il a été montré que la déplétion du PIP2 par différentes conditions comme la mutation d'une enzyme de synthèse du PIP2, dPIP4K, la mutation de canaux ioniques TRP permettant l'entrée de Ca<sup>2+</sup> et l'activation de la phospholipase C (PLC) qui dégrade le PIP2, ou l'expression d'une enzyme de dégradation du PIP2 d'origine bactérienne SigD, entraînait un élargissement des membranes de vésicules endosomales ressemblant à celles observées en condition de surexpression de BIN1iso1 et dans certains cas, la dégénérescence des neurones PRs [224, 410]. Les enzymes du métabolisme du PIP2 représentaient donc des candidats capables de moduler la dégénérescence induite par BIN1iso1. Nous avons donc évalué l'impact d'une surexpression (UAS-dPIP4K) et de 2 mutants de dPIP4K (dPIP4K<sup>HR29</sup> et UAS-dPIP4K<sup>KD</sup>) sur la dégénérescence induite par BIN1.

Nous avons également sélectionné deux autres enzymes de synthèse du PIP2 proches, skittles (sktl) et dPIP5K pour lesquelles nous avons évalué l'impact de la surexpression (UAS-sktl) et d'un mutant (skt <sup>$\Delta$ 5</sup>) de sktl ainsi que de la surexpression (UAS-dPIP5K) et de 2 mutants de dPIP5K (dPIP5K<sup>18</sup> et dPIP5K<sup>30</sup>), sur la dégénérescence induite par BIN1 [66]. De même, nous avons évalué l'impact de la surexpression (UAS-Synj) et de la perte d'une copie (synj<sup>1</sup>) de la synaptojanine (synj), une phosphatase qui dégrade le PIP2, sur la dégénérescence induite par BIN1. De façon intéressante, les niveaux de synaptojanine sont augmentés dans le cerveau des personnes atteintes du syndrome de Down (DS) et il a été constaté que sa surexpression dans des modèles de souris de DS perturbait le métabolisme du PI(4,5)P2 et contribuait aux déficits cognitifs [87]. De plus, cette enzyme a été impliquée dans l'élargissement caractéristique des endosomes précoces observé dans le DS [87] et il est à noter qu'une interaction de cette protéine avec BIN1 a été décrite [307].

Nous avons montré que la surexpression et l'inactivation de sktl n'ont pas impacté la dégénérescence induite par BIN1iso1 avec 6 PRs par ommatidie bien que le mutant sktl ait montré une toxicité anormale chez les mouches contrôles avec 5 PRs par ommatidie (Figure 27A). Nous avons aussi montré que les mutants dPIP4K<sup>HR29</sup> et dPIP5K<sup>18</sup> permettent de préserver légèrement les neurones PRs de la dégénérescence induite par BIN1iso1 avec respectivement, ~5,2 et ~5,5 PRs par ommatidie (Figure 27BC), bien que ce sauvetage n'ait pas été confirmé par les mutants dPIP4K<sup>KD</sup> et dPIP5K<sup>30</sup>, respectivement. Pour finir, nous avons montré que la surexpression de synaptojanine aggravait la dégénérescence induite par BIN1iso1 avec ~4,5 PRs par ommatidie (Figure 27D). Entre nos mains, les mutants de dPIP4K et dPIP5K n'aggravent pas la dégénérescence induite par BIN1iso1 mais empêchent la perte des neurones PRs. De même avec la synaptojanine dont la surexpression accentue la dégénérescence induite par BIN1iso1.

Bien qu'à l'égard de nos résultats, nous ne puissions pas complètement exclure l'existence d'un lien entre le métabolisme de PIP2 et la dégénérescence induite par BIN1iso1, nos données suggèrent néanmoins que la régulation du PIP2 ne permet pas de moduler la toxicité induite par BIN1iso1.



**Figure 27** : Impact de la modulation de régulateurs du métabolisme du PIP2 sur la dégénérescence induite par BIN1iso1. Quantification de la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 lors de la modulation de l'activité des régulateurs du métabolisme du PIP2, Skittles (A), dPIP4K (B), dPIP5K (C) et synaptojanine (D). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ( $p = 3,346 \times 10^{-7}$  pour dPIP4K,  $p = 5,368 \times 10^{-8}$  pour dPIP5K,  $p = 2,199 \times 10^{-3}$  pour synj,  $p = 3,099 \times 10^{-7}$  pour sktl) suivie d'une comparaison de Mann Whitney (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### iv. Modulation de régulateurs des endosomes

Pour évaluer le rôle des endosomes dans la toxicité induite par BIN1, nous nous sommes ensuite intéressés aux protéines Rab, des GTPases de la superfamille des petites protéines G, connues comme régulatrices du trafic endosomal. En l'occurrence, nous avons choisi les protéines Rab5, Rab7 et Rab4/Rab11 pour leur implication, respectivement, dans la biogénèse des endosomes précoces, dans le transport vers les compartiments endocytiques tardifs et dans le recyclage des vésicules à la membrane.

Nous avons observé une inhibition de la neurotoxicité induite par BIN1iso1 via un sauvetage des neurones PR grâce à la surexpression des régulateurs des endosomes précoces Rab5 (UAS-GFP :Rab5) et des endosomes de recyclage Rab11 (UAS-Rab11 :GFP), avec ~5,5 PRs par ommatidie (Figure 28AB). La modulation des régulateurs

de l'endosome tardif Rab7 et Rab9 n'a pas modifié la perte neuronale induite par BIN1iso1 (Figure 28C). Nous avons vérifié par Western blot que l'effet de sauvetage observé de Rab5 et Rab11 n'était pas dû à une diminution de l'expression de BIN1iso1, consécutive à une dilution du Gal4 entre les différentes constructions UAS (Figure 28D).

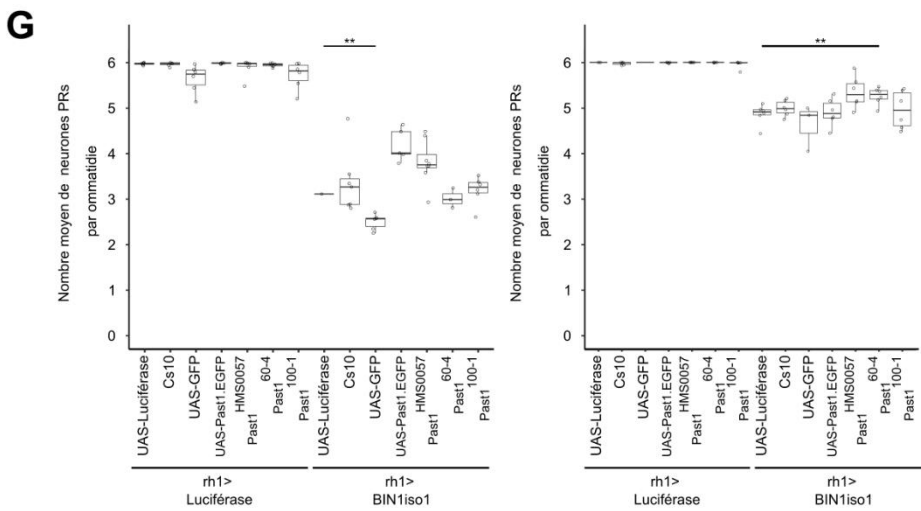
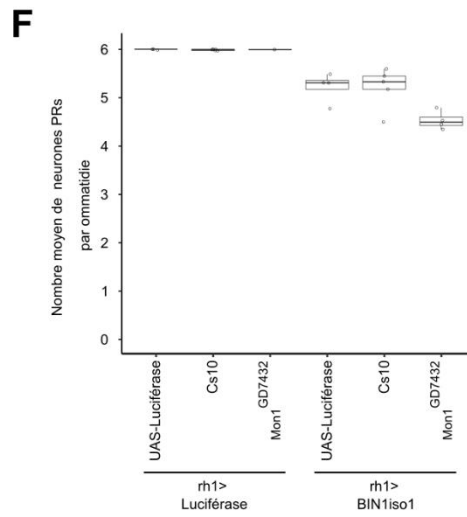
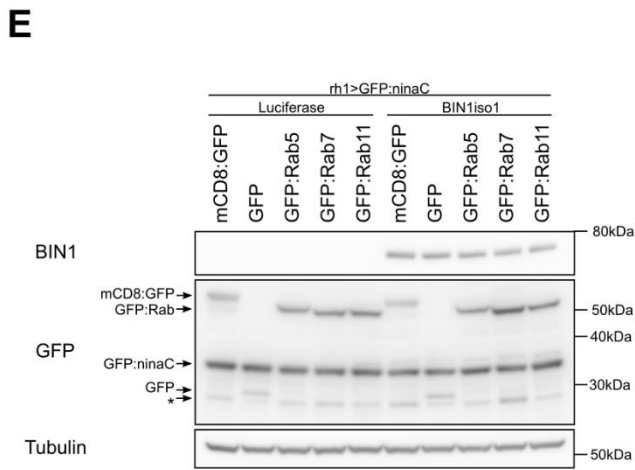
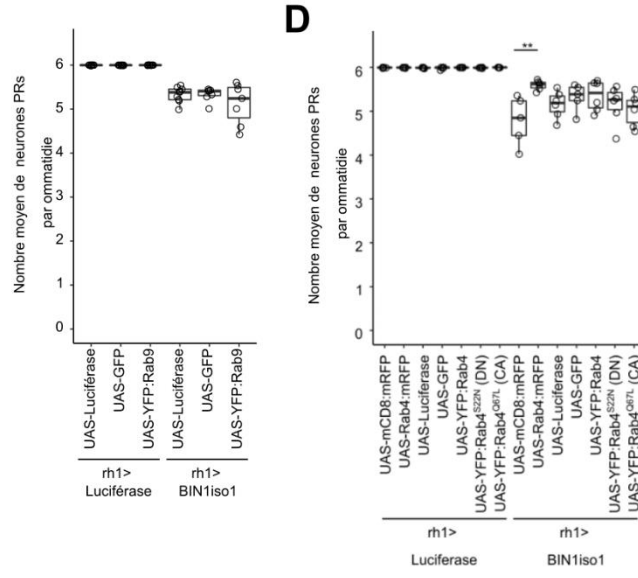
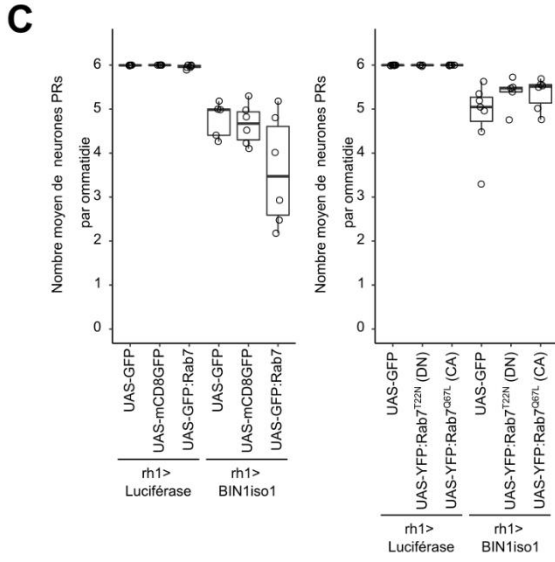
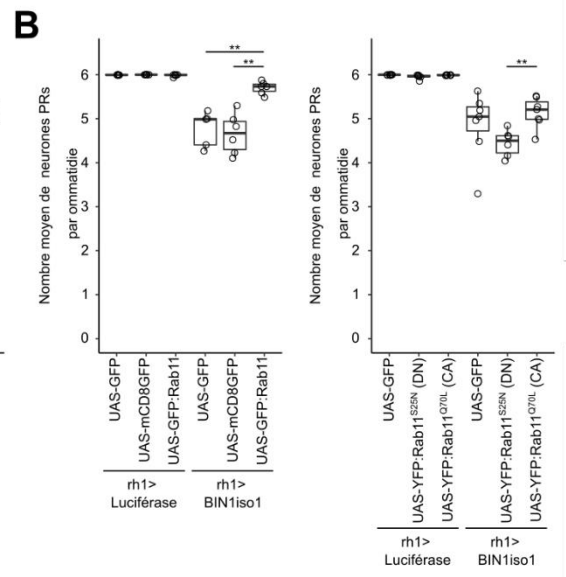
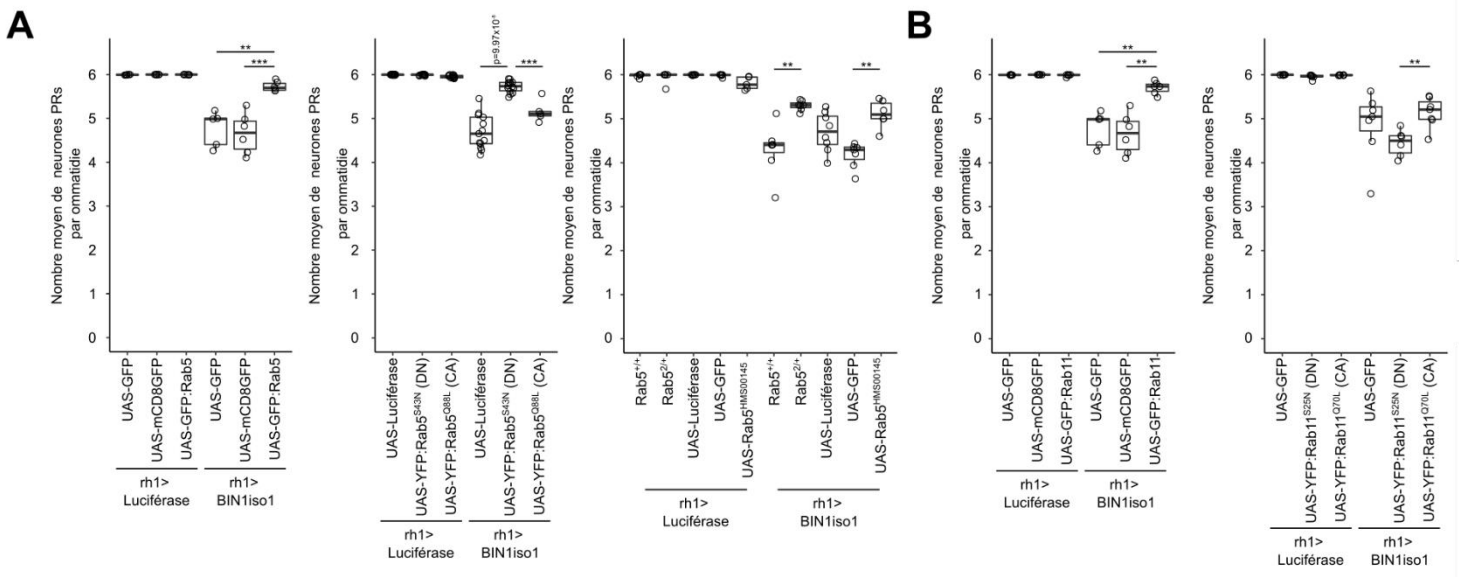
Pour aller plus loin, nous avons évalué l'impact des formes constitutivement actives (CA) et dominant négatifs (DN) pour Rab5 et Rab11, nommées respectivement Rab5<sup>CA</sup> (UAS-YFP :Rab11<sup>Q88L</sup>), Rab5<sup>DN</sup> (UAS-YFP :Rab5<sup>S43N</sup>), Rab11<sup>CA</sup> (P{UAS-YFP :Rab11<sup>Q70L</sup>), Rab11<sup>DN</sup> (P{UAS-YFP :Rab11<sup>S25N</sup>) sur la dégénérescence induite par BIN1iso1. De façon surprenante, Rab5<sup>DN</sup> sauve les neurones PR de la mort induite par BIN1iso1 avec ~5,5 PRs par ommatidie alors que Rab5<sup>CA</sup> n'a que peu, voire pas d'effet (Figure 28A). Cela semble indiquer que, bien que cela soit contre-intuitif, la surexpression du Rab5 sauvage résulterait en une perte de fonction et que cette dernière serait protectrice contre la dégénérescence induite par BIN1iso1. Pour tester cette hypothèse, nous avons testé un mutant hétérozygote (Rab5<sup>2/+</sup>) et une construction ARNi (Rab5<sup>HMS00145</sup>). Nous avons observé qu'en enlevant une copie de Rab5 ou en inhibant son expression, il était possible de prévenir les neurones PR de la dégénérescence avec ~5,5 PRs par ommatidie (Figure 28A), confirmant que la surexpression de Rab5 entraîne une perte de fonction. Contrairement à Rab5, Rab11<sup>DN</sup> augmente la perte neuronale induite par BIN1iso1 avec ~4,5 PRs par ommatidie (bien que non significatif) (Figure 28B). De ce fait, il semblerait qu'un gain de fonction de Rab11 serait protecteur contre la dégénérescence induite par BIN1iso1. Nous avons également testé le régulateur des endosomes de recyclage rapide Rab4. Bien qu'une construction Rab4-mRFP ait sauvé la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 avec ~5,5 PRs par ommatidie, une autre construction Rab4-YFP ne l'a pas fait, ni la construction Rab4<sup>DN</sup>-YFP ou Rab4<sup>CA</sup>-YFP (Figure 28E).

Dans l'ensemble, comme la dégénérescence neuronale a été corrigée par la modulation des régulateurs des endosomes précoces et des endosomes de recyclage, ces résultats indiquaient que la dégénérescence des neurones PRs induite par BIN1iso1 serait due à un défaut au niveau du trafic des endosomes précoces. L'activation des endosomes de recyclage via Rab11 permettrait d'atténuer le blocage au niveau des endosomes précoces.

Dans le but d'approfondir notre investigation quant aux régulateurs de la maturation des endosomes, nous nous sommes intéressés à Mon1, requis pour le remplacement de Rab5 par Rab7 au cours de la conversion des endosomes précoces en endosomes tardifs [97] et PAST1 (Putative Achaete Scute Target 1) car il a été décrit chez les mammifères que BIN1 interagissait physiquement avec EHD1, l'orthologue de PAST1 chez les mammifères, une protéine impliquée dans les endosomes de recyclage [343]. Nous avons ainsi évalué l'impact d'un mutant de Mon1 (Mon1<sup>GD7432</sup>) et de la surexpression (UAS-Past1.EGFP) ainsi que de 2 mutants perte de fonction (Past1<sup>60-4</sup> et Past1<sup>100-1</sup>) et d'une invalidation de PAST1 (Past1<sup>HMS00557</sup>), sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.

D'un côté, nous avons observé que la modulation de Mon1 avait pour conséquence l'aggravation de la dégénérescence induite par BIN1iso1, bien que non significatif (Figure 28F), ce qui pourrait indiquer que le blocage de la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs aurait un effet additif sur la dégénérescence induite par BIN1.

D'un autre côté, nous avons observé un sauvetage de la dégénérescence pour la surexpression et l'invalidation de PAST1 avec ~4 PRs par ommatidie (Figure 28G). Ceci pourrait être explicable si la perte de fonction de PAST1 avait un effet protecteur et si la surexpression de PAST1 avait un effet perte de fonction (comme observé précédemment pour Rab5). Toutefois, aucun effet n'a été observé pour les mutants de PAST1 (Figure 28G), ce qui ne confirme pas l'hypothèse. Il est à noter que les contrôles Luciférase, Cs10 et GFP présentaient une dégénérescence anormalement forte avec seulement 3 PRs par ommatidie (Figure 28G), nous amenant à remettre en cause les résultats de cette expérience. Nous avons donc reconduit les expérimentations et observé que, cette fois-ci, le mutant 60-4 et l'invalidation de PAST1 avait un léger effet protecteur vis-à-vis de la dégénérescence induite par BIN1iso1 avec ~5,5 PRs par ommatidie (Figure 28G). Du fait de la discordance des résultats entre les deux expériences et de l'effet léger de la seconde expérience, nous n'avons pas approfondi davantage l'étude de PAST1 dans le cadre de ce crible.





**Figure 28 : Impact de la modulation de régulateurs des endosomes sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.** Quantification de la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 lors de la modulation respective de l'activité du régulateur d'endosomes précoces Rab5 (A), des régulateurs d'endosomes de recyclage Rab11 (B), Rab4 (D) et PAST1 (G), des régulateurs d'endosomes tardifs Rab7 et Rab9 et du régulateur de la maturation des endosomes précoces en endosomes tardifs (C), du régulateur du remplacement de Rab5 par Rab7, Mon1 (F). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ( $p = 0,003643$  pour Rab5,  $p = 6,169 \times 10^{-6}$  pour Rab5DN et Rab5CA,  $p = 0,0001721$  pour Rab5 mutant et knockdown,  $p = 0,02236$  pour Rab4,  $p = 0,003643$  pour Rab11,  $p = 0,03487$  pour Rab11DN et Rab11CA,  $p = 0,1408$  pour Rab7,  $p = 0,24$  pour Rab7DN et Rab7CA,  $p = 0,8959$  pour Rab9 et  $p = 6,68 \times 10^{-7}$  pour Mon1) suivie d'une comparaison de Mann Whitney (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ). (D) Analyse par Western Blot de l'expression de BIN1iso1, de la GFP et de ses produits de clivage dans les conditions correspondantes, montrant que BIN1 n'est pas diminué dans les conditions dans lesquelles les neurones photorécepteurs sont sauvés. \*Bande non spécifique.

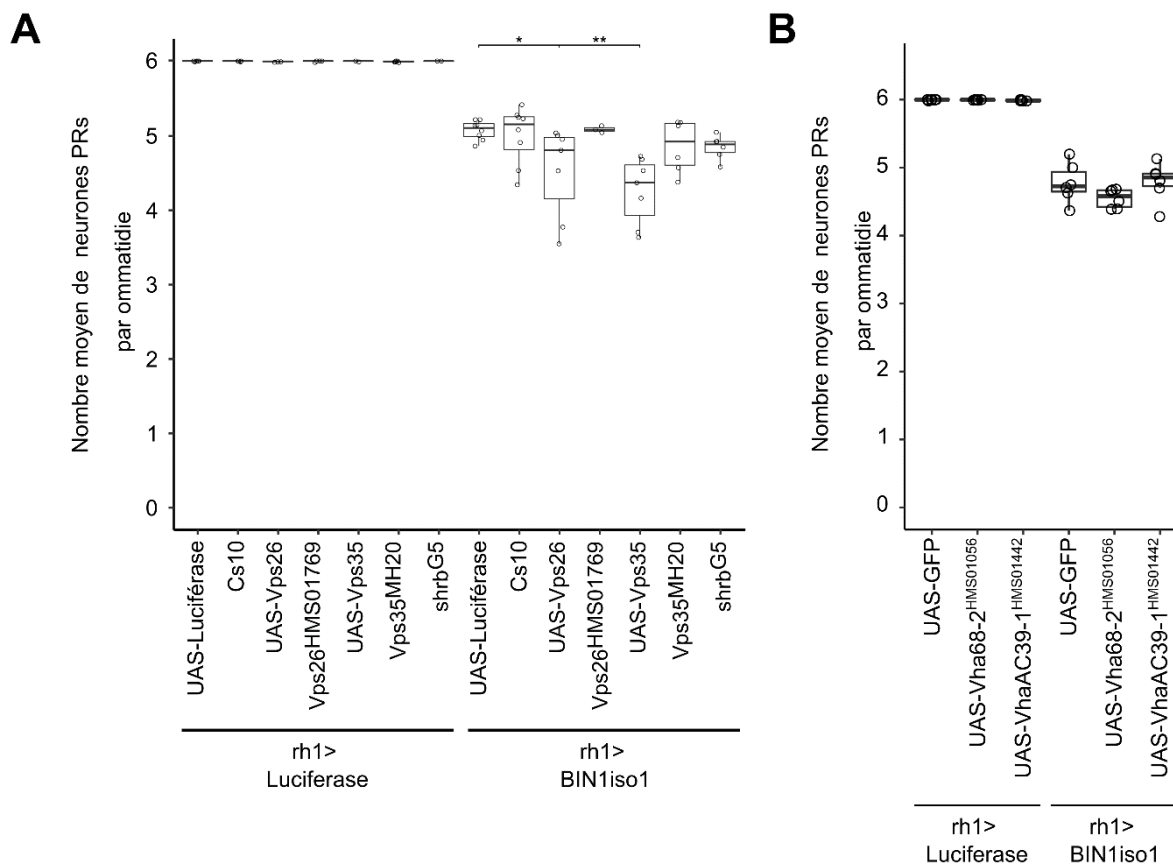
#### v. Modulation de régulateurs du rétromère et du lysosome

En raison de leurs rôles dans le transport rétrograde des protéines des endosomes jusqu'au réseau trans-Golgien, nous nous sommes également intéressés à la voie du rétromère et au complexe ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport). Cette voie joue un rôle essentiel dans trois fonctions biologiques : la régulation endosomale de la signalisation cellulaire, l'autophagie et son importance pour la morphogénèse neuronale et enfin la biogénèse et la fonction de vésicules extracellulaires. Nous avons testé 2 régulateurs de cette voie du rétromère, à savoir Vps 26 et Vps35 (Vps : Vacuolar Protein Sorting), 2 protéines qui interagissent entre elles et forment le noyau du complexe rétromère. Il a été par ailleurs montré que Vps26 et Vps35 étaient impliquées dans des maladies neurodégénératives comme Alzheimer [50, 279, 401, 463, 507]. La 3ème protéine étudiée était Shrub, l'orthologue de CHMP4B, connu pour interagir avec BIN1 [491]. Des études ont également montré qu'un dysfonctionnement du complexe ESCRT III menait à une accumulation d'autophagosome et à une dégénérescence neuronale [90, 188].

Nous avons ainsi évalué l'impact de la surexpression et de l'inactivation de Vps26 (UAS-Vps26 et Vps26<sup>HMS01769</sup>) et de Vps35 (UAS-Vps35 et Vps35<sup>MH20</sup>) ainsi que d'un mutant pour Shrub (shrb<sup>G5</sup>), sur la dégénérescence induite par BIN1iso1. Nous avons alors observé que la surexpression de Vps26 et Vps35 accentuait la toxicité induite par BIN1iso1 indiquant un effet synergique potentiel. En revanche, l'inactivation de Vps26 et de Vps35 n'a pas impacté la dégénérescence induite par BIN1iso1 (Figure 29A). En somme, il semblerait que la suractivation du complexe du rétromère aggrave le phénomène de vacuolisation observé chez les mouches BIN1iso1. Ce résultat est surprenant sachant que l'inactivation du rétromère par perte de fonction de Vps26 a été montré comme induisant la dégénérescence des neurones photorécepteurs en augmentant la charge de la voie endolysosomale, tandis que son activation a un effet protecteur en recyclant des protéines telles que Rh1 au rhabdomère et en soulageant la voie endosomale de dégradation des protéines [471].

En ce qui concerne le mutant Shrub, nous n'avons pas observé d'effet significatif sur la toxicité induite par BIN1iso1 (Figure 29A), suggérant que la voie du complexe ESCRT ne participe pas à la toxicité induite par BIN1iso1, ce qui coïncide avec le fait que nous n'avons pas vu de diminution de la présence de marquage evi-GFP, interprété comme étant des exosomes, dans l'espace interrhabdomérique

En dernier lieu, nous nous sommes intéressés au compartiment terminal de la voie endosome-lysosome, à savoir les lysosomes. Ce sont des compartiments où sont dégradées les protéines en pH acide. Des pompes à protons V-ATPase sont responsables de l'acidification du contenu des vésicules. Une étude a montré que des mutations dans les gènes codant pour des sous-unités de ces pompes pouvaient engendrer une accumulation de lysosomes non fonctionnels menant à un blocage du flux autophagique [297], faisant écho à l'effet de BIN1iso1 dans les neurones PRs. Nous avons sélectionné 2 lignées ARNi connues pour perturber la fonction lysosomale et causer le phénotype évoqué ci-dessus. Ces ARNi ciblent les gènes Vha68-2 et VhaAC39-1 qui codent respectivement la sous-unité catalytique V1 et la sous-unité transmembranaire V0 des pompes V-ATPases. L'inactivation n'a pas modifié la dégénérescence induite par BIN1iso1 (Figure 29B), suggérant qu'une altération de la fonction lysosomale n'est pas à l'origine de la dégénérescence induite par BIN1iso1 ni ne la module.



**Figure 29** : Impact de la modulation de régulateurs du rétomère et du lysosome sur la dégénérescence induite par BIN1iso1. Quantification de la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 lors de la modulation respective de l'activité des régulateurs du rétomère, Vps26 et Vps35 (A), du régulateur du complexe ESCRT, Shrub (A) et de l'ATPase lysosomale (B). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ( $p = 1,334 \times 10^{-10}$  pour les régulateurs du rétomère et du complexe ESCRT,  $p = 0,1394$  pour l'élimination de la sous-unité ATPase lysosomale) suivie d'une comparaison de Mann Whitney (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

#### vi. Recherche de l'implication d'autres facteurs de risque de la MA dans les altérations de la voie endolysosomale induites par BIN1iso1

Nous avons voulu déterminer si Lap et Synd, orthologues respectifs de PICALM et PACSIN3 (locus CELF1/SPI1), deux autres facteurs de risque de la MA, également impliqués dans la voie endosome-lysosome, pouvaient moduler la toxicité induite par BIN1iso1. Ces gènes ont un rôle connu dans l'endocytose, le trafic intracellulaire et la régulation de la taille et du nombre de vésicules synaptiques [128, 237, 465, 505]. Pour rappel, PICALM est l'un des gènes les plus associés à la MA après APOE et BIN1. En outre, PICALM interagit avec Rab5 et Rab11 pour le guidage des vésicules synaptique vers les endosomes [252, 253, 313, 508]. Par ailleurs, il a été montré que l'expression de PICALM est diminuée dans le cerveau des patients atteints de la MA [10, 346]. De surcroit, le knockdown de PICALM peut réduire la genèse d'A $\beta$ 42 et favorise la dégradation de Tau [227, 313, 490, 499]. De plus, il a été montré, que PICALM était capable de rétablir la transmission glutamatergique, les défauts locomoteurs et la survie dans un modèle de toxicité de l'A $\beta$ 42 chez la Drosophile [502] et que la surexpression de PICALM était capable de résoudre les défauts endocytiques causés par APOE [322].

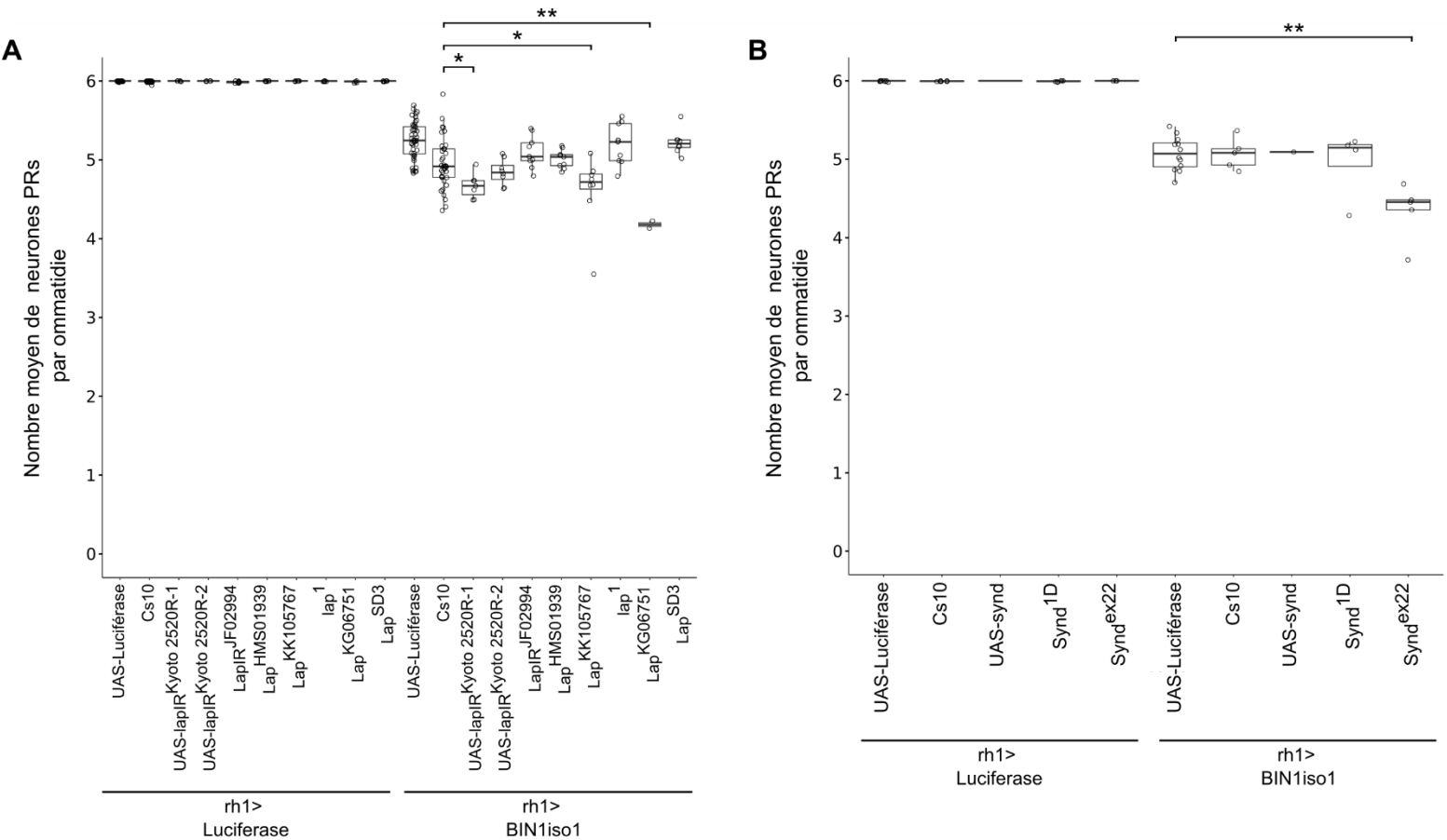
Concernant Lap, nous avons évalué l'impact de 3 mutants (Lap<sup>1</sup>, Lap<sup>SD3</sup> et Lap<sup>KG06751</sup>) et de 5 constructions ARNi (;UAS-LapIR<sup>Kyoto 2520R-1</sup>, Uas-LapIR<sup>Kyoto 2520R-2</sup>, Lap<sup>JF02994</sup>, Lap<sup>HMS01939</sup> et Lap<sup>KK105767</sup>), sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.

Nous avons observé que soit les constructions Lap n'ont pas d'effet, soit elles aggravaient la dégénérescence induite par BIN1 avec une perte neuronale allant de ~5 PRs à ~4,5 PRs par ommatidie (Figure 30A). L'effet constaté pourrait découler d'une combinaison néfaste entre Lap et BIN1iso1. Toutefois pour mieux comprendre

la relation entre BIN1 et Lap, il faudrait mesurer les niveaux d'ARNm de PICALM pour vérifier si toutes les constructions sont efficaces ou non et tester une condition de surexpression pour voir si un gain de fonction est capable de sauver les PRs.

Concernant Synd, nous avons testé une surexpression et 2 mutants (UAS-synd, Synd<sup>1D</sup> et Synd<sup>ex22</sup>). Le mutant Δex22 induit une aggravation significative de la dégénérescence avec ~4,5 PRs par ommatidie, alors qu'aucun effet n'est à signaler pour le mutant 1D ou la surexpression (Figure 30B).

En prenant en compte de l'ensemble des résultats, des investigations supplémentaires sont nécessaires pour clarifier et confirmer l'interaction potentielle entre la dégénérescence induite par BIN1iso1 et Lap/Synd.



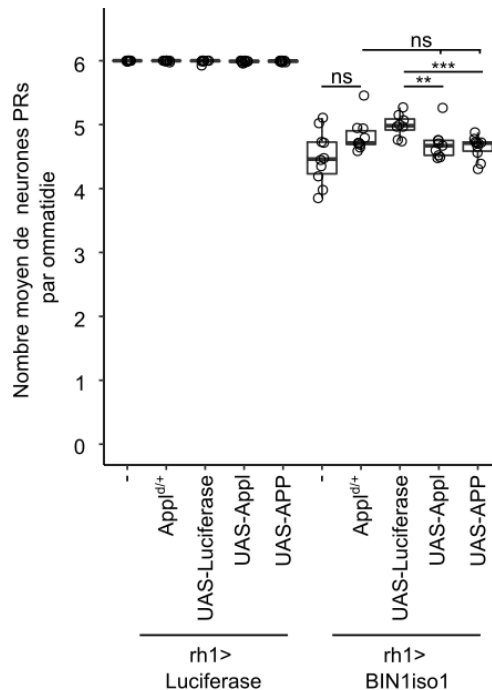
**Figure 30 : Impact de la modulation de facteurs de risque de la MA impliqués dans le trafic intracellulaire sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.** Quantification de la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 lors de la modulation de l'activité de facteurs de risque de la MA impliqués dans le trafic intracellulaire, Lap (**A**) et Synd (**B**). L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ( $p = 2,2 \times 10^{-6}$  pour Lap et  $p = 2,088 \times 10^{-6}$  pour Lap) suivie d'une comparaison de Mann Whitney (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

### vii. Effet de la modulation de l'APP sur la dégénérescence induite par BIN1iso1

La littérature indique que des produits de clivage de l'APP (comme le fragment APP-CTFβ) peuvent être responsables de l'augmentation de la taille des endosomes dans les neurones [218]. L'APP et ses métabolites pourraient être ainsi des médiateurs de la toxicité induite par BIN1iso1.

La Drosophile possède un seul homologue de l'APP, appelé APP Like (Appl), qui est également traité par plusieurs sécrétases et génère des fragments sécrétés, un peptide Aβ-like neurotoxique et un domaine intracellulaire C-terminal (AICD) [62]. De manière intéressante, Appl régule la fonction endolysosomale dans les neurones de la Drosophile [238] et certaines études indiquent que BIN1 pourrait réguler la voie protéolytique de l'APP [458].

Afin de déterminer si l'APP pouvait moduler la toxicité induite par BIN1iso1, nous avons testé 3 constructions : une surexpression (UAS-App1) et un mutant pour App1 (App1<sup>d/+</sup>) ainsi qu'une surexpression de l'APP humaine (UAS-APP). La perte d'une copie d'App1 n'a eu aucun effet, bien que nous ayons observé une tendance à un sauvetage par rapport au contrôle, mais non significatif, ce qui suggère que App1 n'est pas nécessaire à la toxicité induite par BIN1iso1 (Figure 31). La surexpression de l'App1 et de l'APP humaine a significativement augmenté la perte des PRs, par rapport à leur contrôle UAS-Luciférase, avec ~4,5 PRs par ommatidie, mais seulement légèrement en termes d'effet (Figure 31). Le fait que la surexpression ne soit pas différente de la perte d'une copie d'App1 rend l'effet de la surexpression peu convaincant (Figure 31). Globalement, ces expériences suggèrent que l'APP (et potentiellement ses métabolites) ne contribue(nt) pas à la neurotoxicité de BIN1iso1 observée dans notre modèle de Drosophile.



**Figure 31 : Impact de la modulation de l'APP sur la dégénérescence induite par BIN1iso1.** Quantification de la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 lors de la modulation de l'activité de l'APP. L'analyse statistique a été réalisée à l'aide d'un test de Kruskal Wallis ( $p = 0,006947$ ) suivie d'une comparaison de Mann Whitney (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ ).

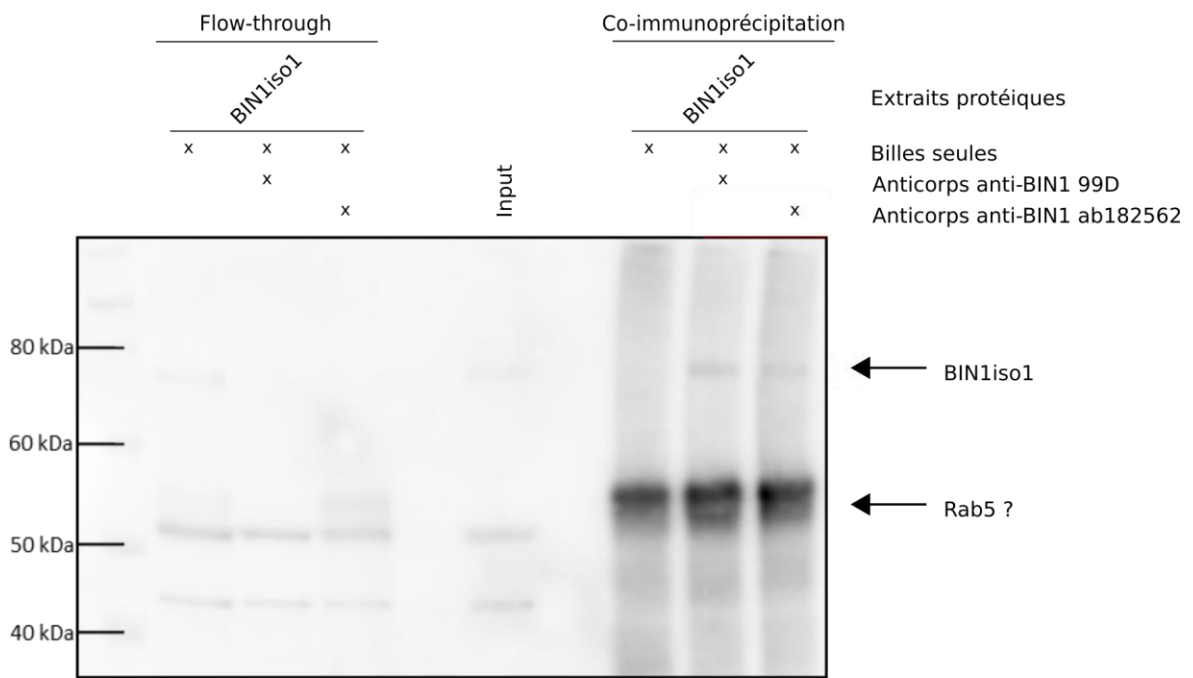
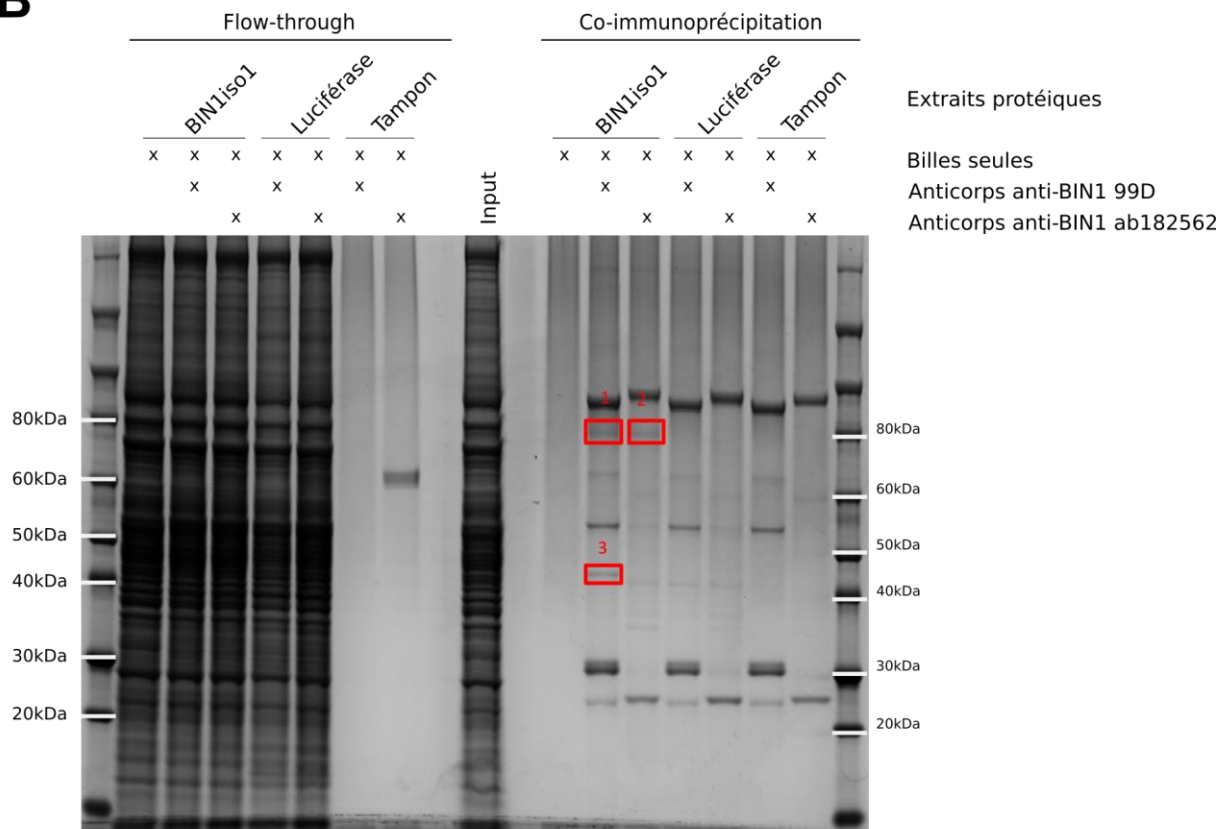
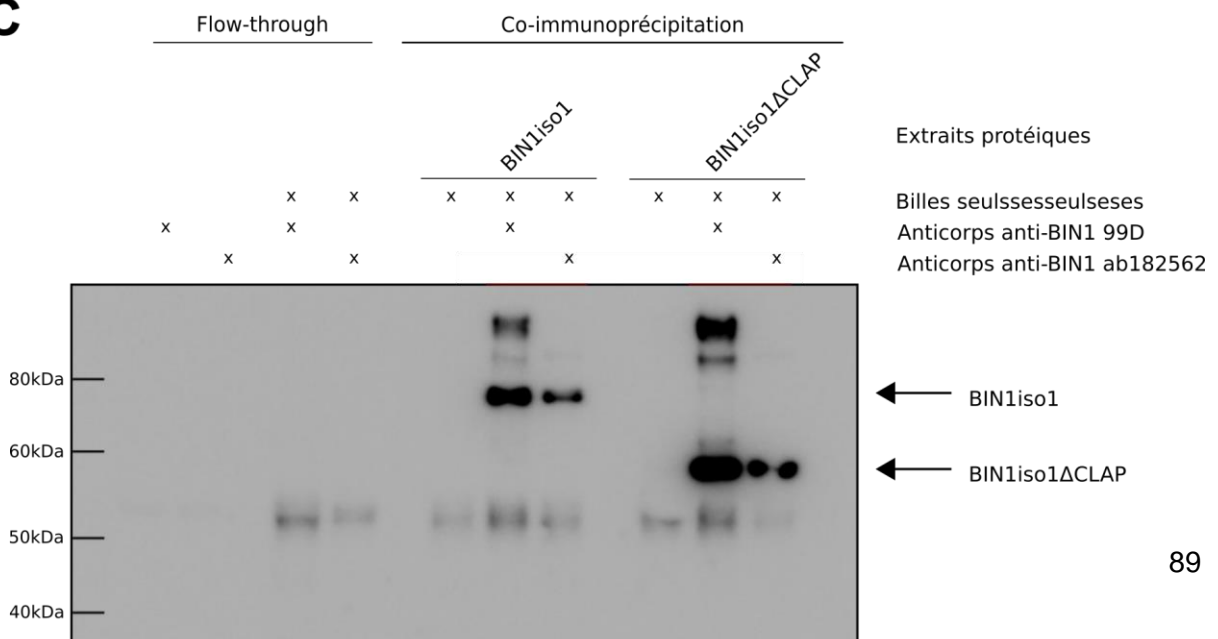
## 2. Recherche de partenaire(s) d'interaction de BIN1

Pour expliquer l'effet délétère de BIN1iso1 sur le trafic intracellulaire et la survie neuronale, il est nécessaire de connaître le mécanisme par lequel BIN1iso1 est capable d'induire la neurodégénérescence. Afin d'identifier une (des) protéine(s) associée(s) à BIN1iso1, nous avons isolé ses partenaires par co-immunoprécipitation. La première approche, par candidat, a été de partir des résultats obtenus en neutralisation de la cornée. Effectivement, comme expliqué ci-dessus, un des premiers facteurs avec lesquels nous avons observé un sauvetage de la toxicité induite par BIN1iso1 a été Rab5. Pour établir l'existence d'une interaction physique entre BIN1 et Rab5, nous avons donc utilisé une lignée Rh1-Gal4;UAS Rab5:GFP;UAS BIN1iso1 dont nous avons extrait les protéines pour ensuite pratiquer une co-immunoprécipitation. Nous sommes parvenus à immunoprécipiter BIN1, bien que le signal soit faible (Figure 32A). Nous avons ensuite cherché à déterminer si lors de l'immunoprécipitation de BIN1iso1, il était également possible d'immunoprécipiter du Rab5. En l'occurrence nous n'avons pas observé de signal clair pour Rab5 et ce, en raison d'un bruit de fond important lié probablement aux chaînes légères des IgG des anticorps. Effectivement, Rab5-GFP est attendue aux alentours des 50 kDa, or, les 2 chaînes légères de IgG font aussi 50kDa (Figure 32A). De plus, nous avons observé un signal aberrant dans la condition bille, puisqu'il n'est censé en avoir, suggérant un artefact de manipulation. En définitive, il n'a pas été possible de montrer que Rab5 interagissait avec BIN1iso1.

En raison de l'absence de résultats de la première approche, nous avons adopté une seconde approche plus systématique qui consistait en l'immunoprécipitation de BIN1, puis l'électrophorèse sur gel d'acrylamide, ensuite la coloration par bleu de Coomassie et enfin l'analyse des bandes d'intérêt par spectrométrie de masse. Le tout à partir d'un extrait protéique initial enrichi par un facteur 5 par rapport au protocole primaire, passant de 40 à 200, le nombre de têtes de *Drosophila* nécessaires à la réalisation de cet extrait protéique.

Parmi les bandes observables à l'issue de co-immunoprécipitation pour BIN1, différentes suivant l'anticorps utilisé, nous avons pu exclure celles résultant de fixation aspécifique et celles présentes dans la condition anticorps seuls, indiquant que ce ne sont pas les partenaires de BIN1 recherchés (Figure 32B). De ce fait, il ne restait plus que 2 bandes de 80kDa et 45kDa. Nous avons vérifié qu'elles n'étaient pas présentes dans la condition contrôle avec extrait protéique sans surexpression de BIN1. La bande de 80kDa (numérotée 1 et 2) semblait correspondre à BIN1iso1, tandis que la bande de 45kDa (numérotée 3) pourrait être un partenaire potentiel de BIN1iso1 (Figure 32B). Nous avons alors fait analyser ces bandes par spectrométrie de masse et il s'est avéré que les bandes 1 et 2 contenaient effectivement BIN1iso1. D'autre part, nous avons aussi identifié 2 partenaires potentiels dans la bande 3. Il s'agit de l'actine et la Yolk protein 3 (Yp3). Ces résultats étaient intéressants car il a été montré que BIN1 était capable de lier l'actine pour en moduler la dynamique [105]. Il a été également montré que BIN1 était impliqué dans la stabilisation des faisceaux d'actine induits par Tau et que la diminution de BIN1 dans un modèle de tauopathie chez la *Drosophila* réduisait l'apparition des inclusions d'actine induites par Tau [105]. Les résultats étaient plus étonnants pour Yp 3 puisque cette protéine est une lipase impliquée dans l'embryogénèse. Cette protéine est également fortement exprimée dans le cerveau de *Drosophila* à l'âge adulte (FlyAtlas Anatomy Microarray). Il a été montré qu'Yp3 est négativement corrélée à la longévité [29]. Cependant, cette protéine n'est, a priori, pas connue dans le trafic intracellulaire. C'est pourquoi, il pourrait être intéressant de tester l'effet de la surexpression et/ou de la sous expression de cette protéine sur la toxicité induite par BIN1iso1.

En parallèle de ces 2 approches, du fait que le domaine CLAP permet d'abroger la mort des neurones PRs, nous avons voulu déterminer l'interactome de BIN1iso1 se liant au domaine CLAP. L'idée étant de déterminer s'il existait des partenaires spécifiques de l'une ou l'autre des 2 formes. Pour ce faire, nous avons réalisé une co-immunoprécipitation différentielle à partir des lignées Rh1-Gal4;;UAS BIN1iso1 et Rh1-Gal4;;UAS BIN1iso1 $\Delta$ CLAP. Tout d'abord il a été possible d'immunoprécipiter correctement la forme complète de BIN1iso1 ainsi que la forme tronquée pour le domaine CLAP aux poids moléculaires attendus, à savoir ~80kDa pour BIN1iso1 et ~55kDa pour BIN1iso1 $\Delta$ CLAP (Figure 32C). Par la suite, nous avons également réalisé un bleu de Coomassie. Malgré un signal plutôt faible, il a été possible d'identifier BIN1 par spectrométrie de masse. Toutefois, aucun partenaire d'interaction n'avait pu être identifié, qu'il soit commun ou spécifique d'une des formes de BIN1iso1.

**A****B****C**

**Figure 32 : Recherche de partenaires d'interaction de BIN1iso1.** **A** Analyse par western blot de la co-immunoprécipitation pour des mouches Rh1-Gal4;UAS-GFP-Rab5;UAS BIN1. Migration en gel 10% bis-tris dans du tampon MOPS. **B** Analyse par Bleu de Coomassie de la co-immunoprécipitation pour des mouches Rh1-Gal4;UAS BIN1-1. Migration en grand gel d'acrylamide 10%. N=200 têtes par condition. **C** Analyse par western blot de la co-immunoprécipitation différentielle entre des mouches Rh1-Gal4;UAS BIN1-1 et Rh1-Gal4;UAS BIN1-1ΔCLAP. Anticorps anti-BIN1. Migration en gel 10% bis-tris dans du tampon MOPS. N=40 têtes par condition. FT : flow-through.

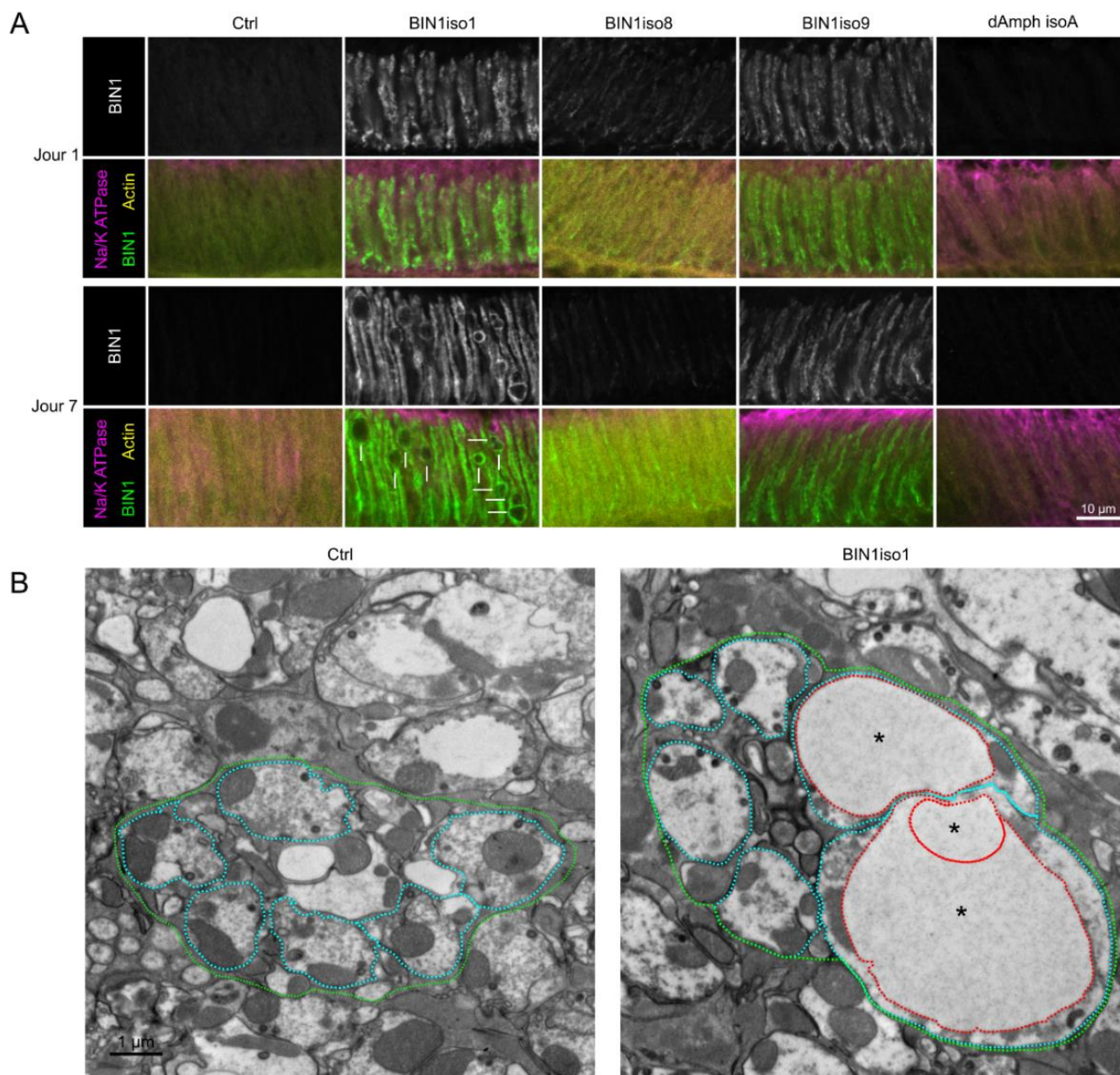
## 4- L'expression de BIN1iso1 engendre une altération de la transmission synaptique dans les neurones PRs

Le dysfonctionnement et la perte des synapses sont des événements précoces dans la MA et il est connu que parmi les différents aspects neuropathologiques caractéristiques de la MA, la perte synaptique est celle qui est le mieux corrélée à la détérioration cognitive que les patients présentent au cours du développement de la maladie. Étant donné que les endosomes sont cruciaux pour la formation des vésicules synaptiques au niveau du compartiment présynaptique et dans le recyclage des récepteurs membranaires au niveau du compartiment post-synaptique, les résultats ci-dessus sont particulièrement intéressants et suggèrent qu'il pourrait y avoir un rôle de BIN1 au niveau synaptique dans le contexte de la MA.

### 1. BIN1iso1 induit des anomalies morphologiques dans les terminaisons synaptiques des neurones photorécepteurs

La dégénérescence induite par BIN1iso1 est caractérisée par une vacuolisation importante dans le corps cellulaire des neurones PRs, dont l'origine était un défaut au niveau des endosomes précoces induit par BIN1iso1. Ainsi pour savoir si ce défaut avait également une répercussion au niveau synaptique, nous avons observé les extrémités synaptiques des neurones PR au niveau de la lamina, zone du lobe optique où se projettent les axones des neurones PRs externe. En utilisant l'immunofluorescence sur des coupes longitudinales de rétines de *Drosophile* âgées de 7 jours, nous avons observé de nombreuses vésicules aux terminaisons synaptiques pour la condition exprimant BIN1iso1 seulement (indiquées par des flèches blanches) (Figure 33A), qui sont compatibles avec la vacuolisation précédemment observée dans les corps cellulaires. A cette occasion, nous avons noté que le marquage indiquait une localisation présynaptique pour BIN1iso1 et BIN1iso9, ainsi que pour BIN1iso8 dans une moindre mesure que la spécificité pour BIN1iso1 n'est pas liée à leur localisation subcellulaire et indiquant potentiellement un rôle dans le compartiment présynaptique. En microscopie électronique sur section transversale, nous avons également observé d'énormes vésicules (ligne pointillée rouge) dans les terminaisons synaptiques (ligne pointillée bleue) regroupées dans une cartouche synaptique (ligne pointillée verte) (Figure 33B). Celles-ci sont similaires en tout point à celles observées précédemment dans les corps cellulaires. Ainsi il semblerait que BIN1iso1 entraîne également des défauts importants de trafic intracellulaire au niveau synaptique et cause de ce fait une synaptotoxicité.





**Figure 33 : BIN1iso1 induit des anomalies morphologiques dans les terminaisons synaptiques des neurones photorécepteurs. (A)** Immunofluorescence des extrémités synaptiques des neurones photorécepteurs exprimant BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9, dAmphA et Luciférase (comme contrôle) sous un driver rh1 au jour 1 et 7. La coloration de BIN1 montre la localisation de BIN1 iso1, BIN1 iso9 et dans une moindre mesure de BIN1 iso8 au niveau du terminal présynaptique aux jours 1 et 7. Le marqueur de membrane plasmique Na/K ATPase spécifique aux neurones et la coloration de l'actine sont utilisés pour marquer les structures. Au jour 7, les extrémités présynaptiques des neurones photorécepteurs exprimant BIN1 iso1 accumulent fortement de grosses vésicules (flèches). **(B)** Analyse par microscopie électronique des terminaux synaptiques des neurones photorécepteurs exprimant la Luciférase et BIN1 iso1. Six terminaux synaptiques (lignes pointillées cyan) sont rassemblés dans une cartouche de lamelles (lignes pointillées vertes). L'expression de BIN1 iso1 entraîne la présence de vésicules gigantesques (\*).

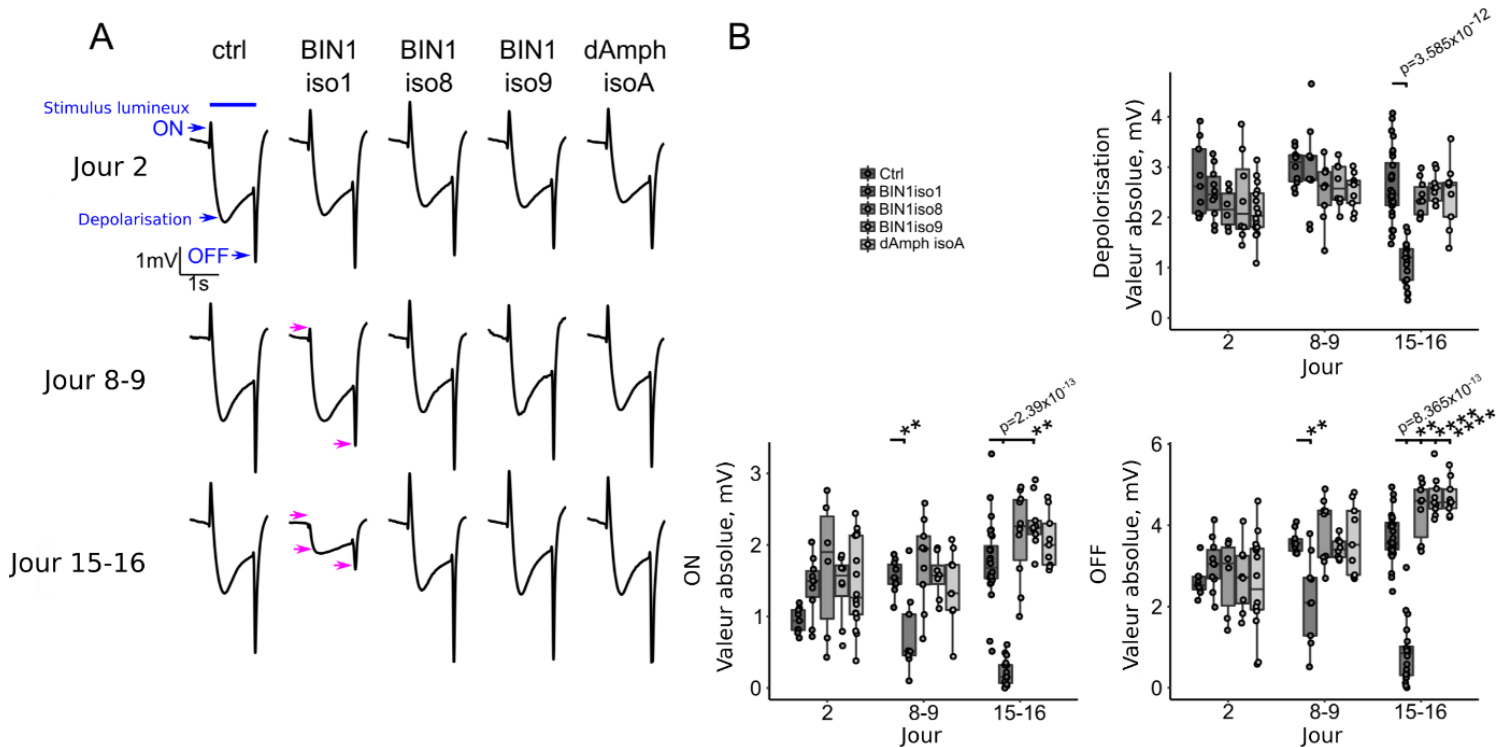
## 2. Altération de l'activité électrophysiologiques dans les neurones photorécepteurs

Nous avons ensuite voulu étudier l'impact de l'expression de BIN1 et de ses isoformes d'un point de vue fonctionnel. En l'occurrence, en collaboration avec l'équipe du Dr Patrik Verstreken (Laboratory for neuronal communication KU Leuven, VIB, Belgique), spécialisée dans l'étude de la neurotransmission et de la perte synaptique dans les maladies neurodégénératives nous avons réalisé des électrorétinogrammes (ERG) sur des



Drosophiles exprimant soit BIN1iso1, soit BIN1iso8, soit BIN1iso9, soit dAmphA. Un ERG se décompose en 3 phases avec 2 signaux transitoires ON et OFF et une phase de dépolarisation. Les signaux ON et OFF reflètent la transmission synaptique et représentent respectivement l'expression du déclenchement et de l'interruption du signal synaptique. La phase de dépolarisation traduit l'activation de la cascade de phototransduction.

Les mouches âgées de 1 jour ne montrent aucun défaut du signal ERG, quelle que soit l'isoforme testée comparativement aux mouches contrôles (Figure 34AB). En revanche, 8-9 jours après éclosion, les mouches surexprimant BIN1iso1 montraient spécifiquement par rapport aux autres isoformes, une diminution des signaux ON/OFF sans pour autant observer d'impact sur la dépolarisation (Figure 34AB). Après 2 semaines de vieillissement, les altérations des signaux ON/OFF étaient encore plus marquées et la dépolarisation présentait à ce moment une diminution de son amplitude (Figure 34AB). La diminution de l'amplitude de la dépolarisation reflète vraisemblablement la dégénérescence des neurones photorécepteurs. Le fait que les signaux ON/OFF diminuent précocement avant la dépolarisation traduit une perte de la transmission synaptique précoce par rapport à la dégénérescence des photorécepteurs. Ainsi, l'expression de BIN1iso1 semble donc provoquer des défauts synaptiques précoces.



**Figure 34 : Altération de l'activité électrophysiologiques dans les neurones photorécepteurs.** (A) Électrorétinogrammes de Drosophiles exprimant BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9, dAmph isoA et Luciférase (comme contrôle) via le promoteur rh1 au jour 2, jour 8-9 et jour 15-16. Spécifiquement pour BIN1iso1, nous avons observé une perte des signaux transitoires ON et OFF (flèches roses) au jour 8-9 suivie d'une perte de tous les paramètres électrophysiologiques, dépolarisation, signaux transitoires ON et OFF (flèches roses) au jour 15-16. (B) Quantification des transitoires de dépolarisation, ON et OFF (analyse statistique par Kruskal Wallis suivie d'une comparaison Wilcoxon).

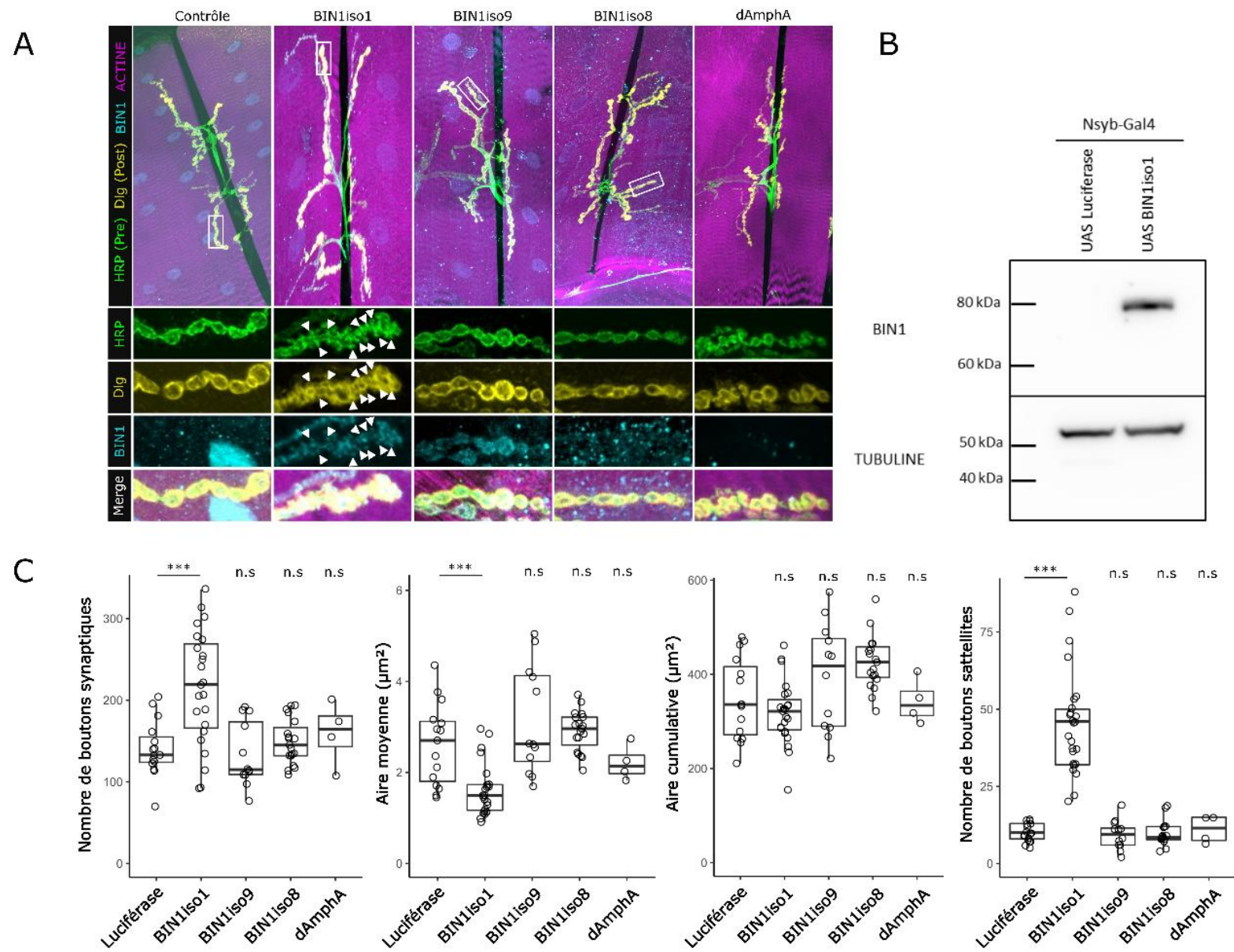
## 5- L'isoforme 1 de BIN1 induit une altération des JNM dépendante de la voie endosomale

Il devient dès lors de plus en plus clair que BIN1iso1 joue un rôle au niveau synaptique dans le contexte de la MA. Pour décortiquer sa fonction à la synapse, nous avons utilisé le modèle de JNM de larve de 3ème stade de Drosophile. Pour rappel, Il s'agit d'une synapse glutamatergique de grande taille entre un motoneurone et une cellule musculaire. Nous avons observé pour chaque larve la même JNM, située entre les cellules musculaires 6/7 dans le segment abdominal A2.

## 1. Phénotype et paramètres morphométriques

Afin de caractériser l'impact de BIN1 sur la morphologie de la JNM, nous avons utilisé le promoteur Nsyb, spécifique des motoneurones pour ainsi exprimer BIN1 dans le compartiment présynaptique au niveau de la JNM. Pour observer ces JNMs, nous avons utilisé un marquage dirigé contre l'actine (phalloïdine) pour visualiser les cellules musculaires et être capable de naviguer à travers la paroi musculaire de la larve. Nous avons également utilisé HRP et Dlg (orthologue de PSD95) pour marquer respectivement le compartiment pré- et post-synaptique. Enfin nous avons utilisé un marquage dirigé contre BIN1 afin de vérifier sa bonne expression dans les JNMs et d'évaluer sa localisation au sein de ces JNMs.

Dans un premier temps, nous avons examiné les JNMs contrôles afin de s'assurer que le phénotype est bien conforme à ce dont est censée ressembler une JNM sauvage. En l'occurrence, nous avons vu que le modèle d'innervation apparaissait comme normal avec des boutons de type Ib de grande taille, bien ronds, aux contours bien définis et un modèle de ramification stéréotypée [280](Figure 35A). Ce même phénotype a été observé chez les larves exprimant BIN1iso8, BIN1iso9 et dAmphA, indiquant que ces isoformes n'impactent pas la morphologie de la JNM. Au contraire, BIN1iso1 présentait spécifiquement une altération structurale de la JNM. De nombreuses altérations morphologiques des JNM sont connues, à l'instar d'un accroissement ou une diminution de la taille des boutons résultant d'une modification de la croissance synaptique, des boutons fantômes qui sont des boutons synaptiques n'ayant pas recrutés d'éléments post-synaptiques et les boutons satellites qui sont des boutons fonctionnels ayant bourgeonnés à partir d'un bouton père. D'un point de vue qualitatif, il semble clair que l'expression de BIN1iso1 altère la forme de la JNM (Figure 35A). En outre, nous avons observé que les boutons synaptiques étaient comme déchetés, rassemblés par endroit en grappe et leurs contours n'étaient pas aussi nets et définis que les boutons contrôles. De plus, nous avons pu apercevoir un certain nombre de boutons satellites, chose qui ne l'avait pas été chez les contrôles. A noter, nous n'avons pas observé de modification dans le développement de l'élément post-synaptique comme cela peut être provoqué par des mutants Dlg [165] suggérant que BIN1iso1 n'a pas d'effet sur la maturation de la synapse. Pour s'assurer que l'effet n'est pas un artefact et provient de l'expression de BIN1, nous avons vérifié que le marquage anti-BIN1 fonctionnait correctement. De cette manière, nous avons confirmé que le promoteur Nsyb permettait d'exprimer convenablement BIN1iso1 au niveau des JNMs avec notamment un signal localisé préférentiellement sur les extrémités des boutons synaptiques vers les surfaces membranaires. Nous avons aussi doublement confirmé l'expression de BIN1iso1 par western blot (Figure 35A). Ces changements morphologiques sont bien la résultante de l'expression de BIN1iso1 (Figure 35B).

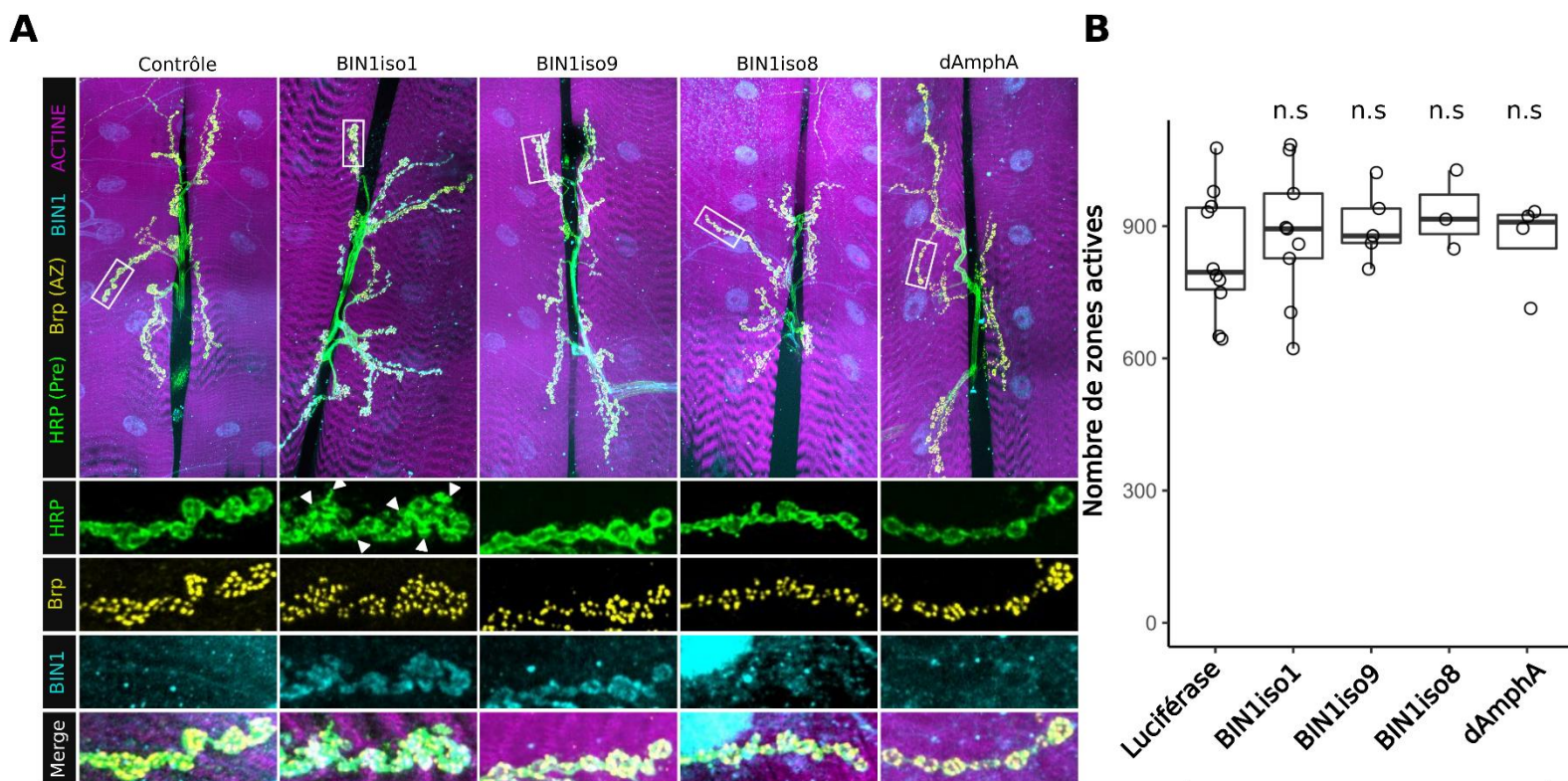


**Figure 35 : BIN1iso1 provoque des altérations morphologiques des JNMs. (A)** Immunofluorescence de JNM de larves 3<sup>ème</sup> stade exprimant BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9 et dAmphA et Luciferase (contrôle) dans les motoneurons avec le promoteur Nsyb. Le marquage HRP est utilisé pour marquer le compartiment pré-synaptique. Le marquage est utilisé pour marquer le compartiment synaptique. **(B)** Analyse par Western Blot de l'expression de BIN1iso1 dans les larves 3<sup>ème</sup> stade. **(C)** Quantification des paramètres morphométriques : nombre de boutons, aire moyenne d'un bouton, aire cumulative de l'ensemble des boutons et nombre de boutons satellites.

Pour caractériser de façon systématique les défauts morphologiques induits par BIN1iso1, nous avons voulu quantifier des paramètres morphométriques spécifiques tels que : le nombre de boutons, la taille des boutons, l'aire cumulative des boutons et le nombre de boutons satellites. Ainsi, nous avons montré que l'expression de BIN1iso1 était associée à une augmentation significative du nombre de boutons, avec ~225 boutons par JNM contre ~150 pour le contrôle, concomitante à une diminution de la taille de ces boutons avec une aire moyenne de ~1,75µm<sup>2</sup> contre ~2,5µm<sup>2</sup> pour le contrôle (Figure 35C). L'aire cumulative des boutons, soit l'espace total couvert par les boutons au sein de la JNM, n'a pas été modifiée par l'expression de BIN1iso1 (Figure 35C). De plus, nous avons également pu confirmer une augmentation de boutons satellites dans les JNMs des larves BIN1iso1 avec ~40 boutons satellites par JNM contre ~10 pour le contrôle (Figure 35C).



Pour finir, nous avons voulu tester un aspect un plus fonctionnel en essayant de mettre en évidence et de quantifier le nombre de zones actives (ZA) en utilisant le marqueur Brp (Bruchpilot). Les zones actives sont des compartiments riches en vésicules synaptiques au niveau des synapses, où des interactions moléculaires orchestrées avec précision contrôlent la fusion des vésicules synaptiques avec la membrane présynaptique. La libération ultérieure de neurotransmetteurs au niveau du compartiment post-synaptique constitue la base de la communication neuronale. De façon intéressante, les caractéristiques structurales, fonctionnelles et moléculaires des ZAs peuvent différer considérablement d'un système à l'autre et les propriétés des ZAs peuvent être modifiées par des changements dans l'activité cellulaire [78, 244, 435]. Etant donné que les ZAs sont des sites de plasticité qui façonnent le comportement animal, nous avons donc testé l'impact de l'expression des isoformes de BIN1 sur le nombre de zones actives (Figure 36A) et nous n'avons observé aucune modification de ce nombre (Figure 36B), quel que soit l'isoforme testée, indiquant que BIN1iso1, a priori, n'intervient pas sur le nombre de zones actives. Toutefois, il faudrait par exemple vérifier qu'il n'y ait pas d'anomalies au niveau des vésicules synaptiques dans les zones actives pour déterminer si BIN1 a un impact sur la physiologie de la JNM.



**Figure 36 : BIN1iso1 n'impacte pas le nombre de zones actives des JNMs.** **A** Immunofluorescence de JNM de larves 3ème stade exprimant BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9 et dAmphA et Luciférase (contrôle) dans les motoneurones avec le promoteur Nsyb. Le marquage HRP est utilisé pour marquer le compartiment pré-synaptique. Le marquage Bruchpilot est utilisé pour marquer les zones actives. **B** Quantification du nombre de zones actives.

## 2. Rétablissement du phénotype initial par l'expression de Rab11

Précédemment, nous avons montré, dans le modèle de neurones PRs, que BIN1iso1 entraînait leur dégénérescence via à un défaut au niveau du trafic des endosomes précoces et que l'activation des endosomes de recyclage via Rab11 permettait d'atténuer le blocage au niveau des endosomes précoces. De surcroît, nous savons que le trafic intracellulaire est crucial pour la fonction synaptique et une altération de cette voie de signalisation pourrait entraîner des défauts synaptiques, tant sur la morphologie de la synapse que sur son activité. Or, BIN1iso1 est connu comme étant impliqué dans la courbure membranaire et l'endocytose et de ce fait, une dérégulation de BIN1 pourrait, à l'instar des neurones PRs, déclencher des anomalies du trafic

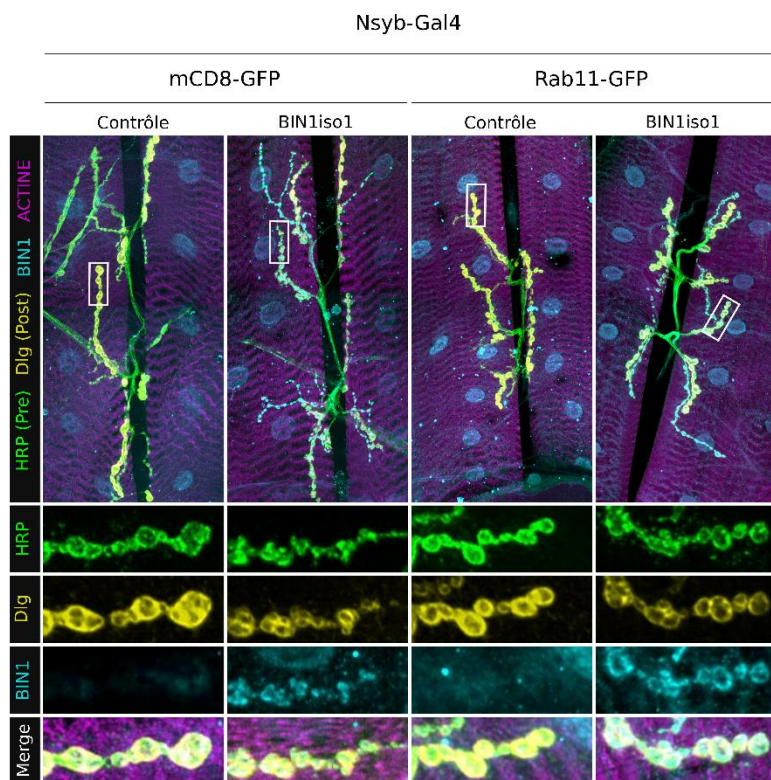
intracellulaire et perturber la morphologie de la synapse. Pour tester cette hypothèse, nous avons exprimé le régulateur des endosomes de recyclage Rab11, dans le but de savoir s'il était possible de rétablir le phénotype des JNMs induit par BIN1iso1 à un aspect sauvage.

Pour ce faire, nous avons réalisé des dissections de larves issues de mouches exprimant soit BIN1iso1 seule soit BIN1iso1 et Rab11, ainsi que leurs contrôles respectifs, selon le même protocole qu'auparavant et examiné les JNMs entre les muscles 6/7 dans le segment abdominal A2.

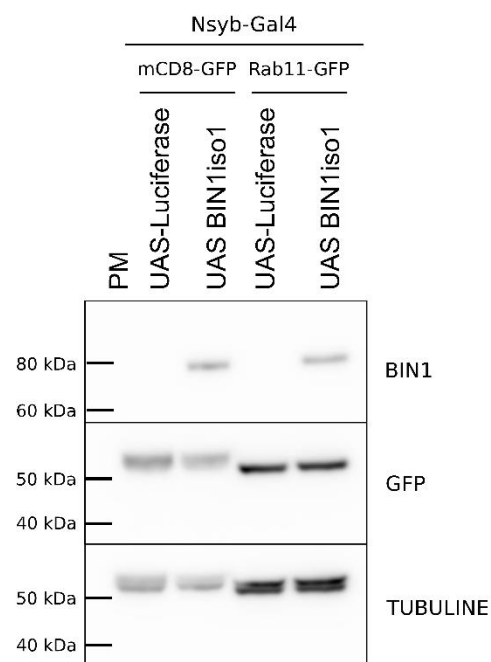
Similairement aux expériences précédentes, les JNMs sauvages exhibent une morphologie normale avec des boutons synaptiques ronds et bien définis, de même que les JNM exprimant Rab11 seule, excluant un impact de l'expression de Rab11 sur la morphologie de la JNM (Figure 37A). Nous avons aussi retrouvé le phénotype typique induit par BIN1iso1 avec des JNMs aux boutons synaptiques déchirés et irréguliers, ainsi que la recrudescence de boutons satellites (Figure 37A). Les JNMs des larves exprimant BIN1iso1 et Rab11 semblaient présenter une configuration plus proche des conditions contrôles que de BIN1iso1 seule, avec des boutons bien ronds et définis (Figure 37A). L'analyse par Western Blot nous a permis de nous assurer que les morphologies observées résultaient de la bonne expression des gènes testés (Figure 37B). Pour confirmer ces observations, nous avons réitéré l'analyse morphométrique des JNMs. Nous avons pu ainsi confirmer que l'expression de Rab11 permettait de restaurer le phénotype sauvage aux JNMs des larves exprimant BIN1iso1. Effectivement, alors que les JNMs BIN1iso1 présentaient ~250 boutons les JNMs BIN1iso1 Rab11 n'en comptaient que <200 (Figure 37C). De même pour la taille des boutons avec une moyenne de ~1,5 $\mu\text{m}^2$  pour les JNMs BIN1iso1 contre >2 $\mu\text{m}^2$  pour les JNMs BIN1iso1 Rab11 (Figure 37C). En revanche, l'expression de Rab11 ne semble pas impacter le nombre de boutons satellite avec une moyenne commune de ~15 boutons satellites par JNM ((Figure 37C).

Par conséquent, il semblerait que la régulation d'un régulateur des endosomes de recyclage soit capable de restaurer partiellement le phénotype suite à l'expression de BIN1iso1, soutenant le rôle de la voie endosomale comme mécanisme de toxicité de BIN1iso1.

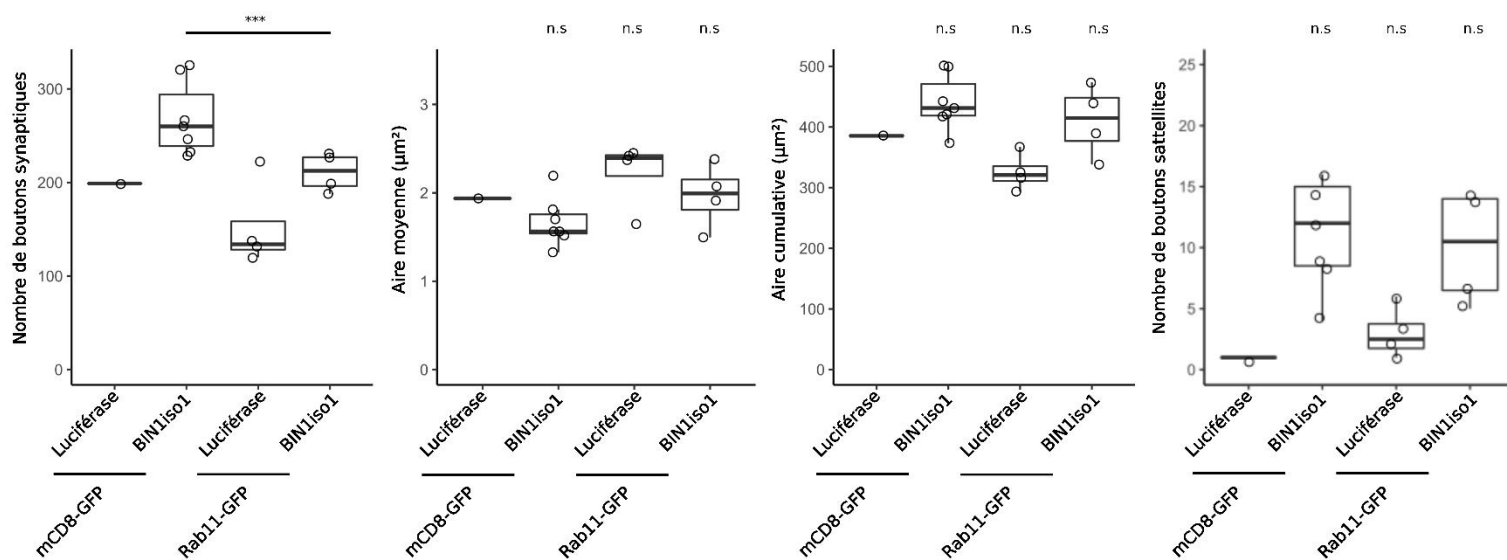
**A**



**B**



**C**



**Figure 37 : Rab11 sauve partiellement les défauts morphologiques induits par BIN1iso1.** (A) Immunofluorescence de JNM de larves 3ème stade exprimant BIN1iso1 et/ou Rab11 dans les motoneurones avec le promoteur Nsyb. Le marquage HRP est utilisé pour marquer le compartiment pré-synaptique. Le marquage est utilisé pour marquer le compartiment synaptique. (B) Analyse par Western Blot de l'expression de BIN1iso1 et des constructions GFP. (C) Quantification des paramètres morphométriques : nombre de boutons, aire moyenne d'un bouton, aire cumulative de l'ensemble des boutons et nombre de boutons satellites.



# Discussion





Au cours de cette thèse, nous avons évalué la fonction et la neurotoxicité potentielle des isoformes humaines de BIN1 dans les neurones PRs de la Drosophile. Nous avons montré que l'expression de l'isoforme 1 de BIN1 et non des autres isoformes, entraînait une dégénérescence neuronale progressive avec l'âge des neurones PRs de façon isoforme spécifique et dose indépendante. Bien que la sensibilité de ces neurones à la lumière puisse suggérer l'activation de la cascade de phototransduction comme cause possible de la toxicité induite par BIN1iso1, nous avons montré que la dégénérescence n'en dépendait pas. Nous avons en plus observé que cette toxicité neuronale est associée à une forte accumulation de vésicules portant des marqueurs endosomaux précoces et tardifs, suggérant qu'une expression altérée de l'isoforme 1 en particulier peut provoquer des défauts dans la voie endosome-lysosome qui contribuent à la dégénérescence neuronale. Grâce à un criblage de régulateurs de la voie endosome-lysosome nous avons observé que la dégénérescence a été prévenue par une perte de fonction du régulateur des endosomes précoces Rab5 et un gain de fonction du régulateur des endosomes de recyclage Rab11. Pour comprendre le rôle de BIN1 dans la pathophysiologie de la MA, nous avons étudié son interaction avec l'APP et avons pu conclure que la neurotoxicité induite par BIN1iso1 était indépendante de l'APP dans notre modèle de Drosophile. En ce qui concerne Tau, nous n'avons pas cherché à connaître si la régulation de l'expression de Tau était capable de moduler la dégénérescence induite par BIN1iso1. En revanche, une étude antérieure a montré que la diminution de l'expression de dAmph permettait de supprimer la toxicité induite par Tau dans les neurones PRs des yeux de Drosophile [70]. En somme, il semblerait que la dérégulation de l'expression de BIN1 médie le risque de développer la MA en contribuant à l'élargissement précoces des endosomes et en modulant la pathologie Tau.

Le trafic intracellulaire est crucial au niveau synaptique pour la formation et la sécrétion des vésicules synaptiques dans le compartiment présynaptique et pour le recyclage des récepteurs membranaires dans le compartiment post-synaptique. Or la perte synaptique est un élément précoce dans la pathogenèse de la MA. C'est pourquoi au cours de cette thèse, nous avons évalué la fonction et la neurotoxicité potentielle des isoformes humaines de BIN1 au niveau synaptique chez la Drosophile. Nous avons notamment montré que l'expression de BIN1iso1 entraîne spécifiquement une altération de la transmission synaptique, se traduisant par une perte des paramètres électrophysiologiques des ERGs, au cours du temps ainsi que l'accumulation de grandes vésicules dans les terminaisons synaptiques des neurones PRs. Ces résultats ont suggéré que BIN1iso1 pourrait être impliqué dans le dysfonctionnement synaptique dans les phases précoces de la MA. En l'occurrence, en utilisant le modèle de JNMs de larves 3ème stade de Drosophile, nous avons montré que la surexpression de BIN1iso1 dans le compartiment présynaptique, a engendré des altérations morphologiques des JNMs avec des boutons synaptiques perdant leur aspect circulaire et associés en grappe. Entre outre, les boutons synaptiques présentaient un nombre plus important par JNM et une aire moyenne réduite. De plus, nous n'avons pas observé de changements significatifs dans le nombre de ZAs. Compte tenu des rôles connus de BIN1 dans le remodelage membranaire et le trafic intracellulaire, nous avons évalué l'impact de l'expression du régulateur de recyclage de l'endosome Rab11 sur les altérations morphologiques induites par BIN1iso1 et avons constaté que Rab11 était capable de restaurer partiellement le phénotype de type sauvage.

## 1- BIN1 et défauts endosomaux

Au cours de ces travaux de thèse, nous avons utilisé 56 constructions transgéniques pour 23 régulateurs de la voie endosome-lysosome. Parmi l'ensemble de ces régulateurs qui ont été testés, nous n'avons pas systématiquement creusé plus profondément lorsque la modulation de ces régulateurs n'impactait pas ou aggravait la dégénérescence induite par BIN1iso1. Effectivement, nous avons préféré nous focaliser sur les résultats apportant un sauvetage qui est sûrement plus spécifique que les lignées aggravant le phénotype afin de détecter une voie de signalisation potentiellement impliquée dans la neurotoxicité induite par BIN1iso1. Néanmoins, parmi les résultats qui ont aggravé la dégénérescence, il se peut qu'il y ait des éléments à explorer davantage, d'autant plus que nous n'avons pas testé toutes les constructions disponibles pour les gènes sélectionnés et que certaines lignées ARNi n'étaient peut-être pas suffisamment efficaces. En outre, les lignées

disponibles dans le Bloomington Drosophila Stock Center, n'ont pas toutes fait l'objet d'études scientifiques, signifiant qu'elles ne sont pas toutes caractérisées. Pour s'assurer de l'efficacité des lignées pour lesquelles aucune donnée n'est disponible, il faudrait vérifier leurs niveaux d'expression par PCR.

Toutefois, il est toujours possible d'établir des hypothèses ou des suppositions pour expliquer l'absence d'effet de la modulation des régulateurs de la voie endosome-lysosome :

(i) *Gαq* est impliquée dans la réponse au stimulus lumineux et qu'une perte de fonction entraîne une diminution du traitement lumineux, liée à une latence de la réception du stimulus lumineux [406]. Ainsi, nous aurions pu potentiellement nous attendre à une dégénérescence moindre puisque celle-ci est aggravée par la lumière. Toutefois, *Gαq1* n'a pas eu d'effet sur la toxicité induite par BIN1 et au contraire, il a plutôt tendance à l'aggraver, indiquant définitivement que la dégénérescence n'est pas causée par un défaut de la cascade de phototransduction.

(ii) Les résultats obtenus pour AP-2 et la clathrine ne récapitulent pas les effets décrits dans l'étude de Kamalesh et al. Concernant AP2 $\alpha$ , cela pourrait s'expliquer par le fait que son invalidation n'est pas suffisante pour enrayer la CME et qu'il existe probablement des mécanismes endocytiques compensatoires expliquant le manque d'effet de ce régulateur. Dans le cas du dominant négatif de la clathrine, il est important de préciser que la clathrine n'est pas impliquée uniquement dans la formation de vésicules à partir de la membrane plasmique mais également dans la formation de vésicules à partir d'autres organites [403], ainsi la dérégulation de ces processus membranaires par le dominant négatif de la clathrine, en synergie avec BIN1, aurait pour conséquence une dégénérescence accrue.

(iii) Pour la synaptojanine, le résultat de la surexpression colle avec les éléments de la littérature. Effectivement, cette enzyme a été impliquée dans l'élargissement caractéristique des endosomes précoces observé dans le DS [87] et elle interagit avec BIN1 [307]. De l'autre, nous n'avons pas observé d'effet de la perte d'une copie de *synj*. Or nous aurions pu nous attendre à l'effet inverse de la surexpression, à savoir un effet de sauvetage. Pour cela, il faudrait peut-être aller plus loin en testant la perte des 2 copies. Par ailleurs cela est vrai pour tous les mutants que nous avons testés, qui étaient toujours à l'état hétérozygote.

(iv) Il a été montré que la dynamine et les protéines apparentées comme Drp1 (Dynamin related protein 1) est associée à une fragmentation mitochondriale, observée dans la MA, lorsque celle-ci est phosphorylée par GSK3 $\beta$  [228]. Si cette fragmentation existe chez les mouches exprimant BIN1iso1, l'invalidation de *shibire* permettrait hypothétiquement d'abroger ce phénomène n'aggravant pas le phénotype sans pour autant être capable de le restaurer.

(v) l'absence d'effet pour le mutant 1D pourrait s'expliquer par la différence de degré de perte de fonction entre les 2 mutants [256]. Hormis ce fait, l'aggravation de la dégénérescence pourrait s'expliquer par le fait que *Synd* est impliqué dans les processus endocytiques et dans la formation des vésicules synaptiques [14, 246]. De ce fait, le mutant *Synd* pourrait altérer ces processus, engendrant une augmentation des vésicules dans les neurones, potentialisant la toxicité induite par BIN1iso1.

Pour confirmer les résultats obtenus dans le modèle de neurone PRs, nous avons évalué si l'impact observé de BIN1iso1 était conservé dans un modèle de mammifère et plus précisément dans un modèle de neurones humains induits (Nhis). En collaboration avec le groupe du Dr Marcos Costa, spécialisé dans les cellules souches pluripotentes induites (IPSCs), nous avons testé l'impact de la délétion de BIN1 dans ces Nhis en quantifiant le nombre et la taille des endosomes exprimant la protéine « Early Endosome Antigen 1 » (EEA1) dans des cultures 2D et 3D (organoïdes cérébraux). EEA1 est connue pour être une protéine effectrice de la protéine endosomale Rab5 et joue un rôle dans l'ancrage des vésicules endocytiques afin la fusion avec les endosomes précoces [75]. Il a été observé une augmentation de la distribution relative des endosomes de petits volumes dans les conditions BIN1 KO comparé à la condition sauvage (Figure 38A). Parallèlement, le nombre d'endosomes n'a pas présenté de changement entre les 2 génotypes (Figure 38B). Cela suggère donc que BIN1 est impliqué dans la régulation de la taille des endosomes précoces dans des neurones humains.

Sur la base de cette observation et compte tenu de ce qui a été observé précédemment chez la Drosophile, nous avons évalué la spécificité de l'effet de BIN1iso1 sur le processus d'endocytose. Nous avons montré que la délétion de BIN1iso1 a entraîné une diminution de la taille des endosomes précoces et que l'expression de l'isoforme 1 et non la 9, dans les Nhis BIN1 KO, permettait de rétablir le volume des endosomes précoces à des valeurs similaires à celles des Nhis sauvage (Figure 38C). Conformément aux résultats obtenus chez la Drosophile, nous avons observé que la surexpression de BIN1iso1 dans les neurones humains produit une augmentation de la taille des endosomes précoces (Figure 38D), suggérant que l'expression de BIN1 doit être finement régulée pour permettre un trafic intracellulaire approprié dans les neurones. Cet effet n'a pas été observé lorsque l'isoforme 9 était surexprimée et une réduction de la taille des endosomes a même été observée. Étant donné que BIN1 est capable de former des dimères via son domaine BAR [372], nous pouvons imaginer que BIN1iso9 puisse se dimériser avec BIN1iso1 et inhiber la fonction de BIN1iso1 d'une manière dominante négative, indiquant potentiellement un niveau de complexité supplémentaire dans la régulation des fonctions de BIN1 au niveau protéique. Ces résultats sont en outre étayés par des expériences de surexpression de BIN1iso1 dans Nhis où nous avons observé une réduction de 30 % de la proportion de neurones par rapport aux témoins, suggérant que le dysfonctionnement endosomal causé par BIN1iso1 est vecteur de dégénérescence. Étonnamment, cette réduction n'a pas été observée dans Nhis BIN1 KO, suggérant que seule l'expression de l'isoforme 1 au-delà du contexte physiologique pourrait être toxique pour les neurones.

Nos résultats indiquent qu'en fonction du contexte et des isoformes, BIN1 a des fonctions spécifiques. Effectivement, alors que l'expression de BIN1iso1, BIN1iso8 et BIN1iso9 donne lieu à des défauts développementaux, non spécifiques de l'isoforme et dose-dépendants, avec une altération de la morphogénèse des rhabdomères des neurones PRs, à l'âge adulte, l'expression de BIN1iso1 induit une dégénérescence des neurones PRs, spécifiquement pour cette isoforme et de façon dose-indépendante. De plus, dans les neurones humains, nous avons pu remarquer une diminution de l'expression des isoformes de bas poids moléculaire (probablement BIN1iso9) au profit des isoformes de haut poids moléculaire (probablement BIN1iso1) entre les IPSCs et les Nhis. Additionnellement à cela, l'expression de BIN1iso1 a permis de restaurer la taille des endosomes précoces, ce que n'a pas été capable de faire BIN1iso9. En somme, ces résultats indiquent que BIN1iso1 joue un rôle important dans les cellules neuronales matures, soutenant le fait que BIN1iso1 est spécifique des neurones et possède des fonctions uniques en leur sein [389, 510].

Nos résultats indiquent, dans les neurones, un rôle direct de BIN1iso1 au carrefour des endosomes précoces soutenu par le fait que (i) l'expression de BIN1 a entraîné l'apparition de larges vésicules positives pour des marqueurs des endosomes précoces (ii) Rab5 permet d'empêcher la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1 et (iii) la taille des endosomes précoces est modulée par BIN1iso1 dans les Nhis. Bien entendu, la taille aberrante des vésicules observées chez la Drosophile peut s'expliquer par le fait d'exprimer une protéine humaine dans un système hétérologue, entraînant ainsi des phénotypes plus marqués.

De plus, parmi toutes les vésicules observées chez la Drosophile, une certaine proportion d'entre elles présentaient également des marqueurs des endosomes tardifs/CMV et, plus rarement, du lysosome. Cependant, la régulation des endosomes tardifs/CMV ou de la fonction lysosomale n'a pas moduler la dégénérescence des PRs et n'a pas bloqué la sécrétion des exosomes, suggérant que les défauts induits par BIN1iso1 ne se produisent pas à ce niveau. En outre, BIN1 est vraisemblablement impliquée dans l'endocytose en raison de sa capacité à interagir avec la clathrine, les protéines adaptatrices (AP) et les dynamines [100, 160, 208, 370, 481]. Puisque certaines de ces protéines sont également impliquées dans le bourgeonnement des vésicules à partir d'organites intracellulaires [208], BIN1iso1 pourrait également inhiber le bourgeonnement des vésicules à partir des membranes des endosomes précoces, conduisant ainsi à une augmentation de leur taille. De ce fait, l'effet sauvetage d'un gain de fonction de Rab11 proviendrait du fait que la surexpression de Rab11 permette de passer outre le blocage induit par BIN1iso1 via l'activation des endosomes de recyclage en participant à réduire significativement la taille des endosomes précoces. Le rôle de BIN1 directement sur les endosomes est étayé par des observations à la fois au niveau des grandes vésicules chez la Drosophile et par l'effet de la suppression de

BIN1 dans des organoïdes cérébraux qui conduit à une réduction de la taille des endosomes précoces, sans affecter la taille des endosomes l'expression de gènes impliqués dans la voie du trafic endosome. Enfin, nous avons montré, chez la Drosophile, que la neurotoxicité de BIN1 nécessitait le domaine CLAP qui interagit avec des protéines de trafic intracellulaire comme les clathrines et les protéines adaptatrices AP [370]. Cette régulation des endosomes précoces est liée à un rôle plus large de BIN1 dans la régulation du trafic intracellulaire allant de l'endocytose [60, 481] au recyclage des endosomes [458] ainsi qu'à des processus connexes dans les compartiments neuronaux pré- ou post-synaptiques [390, 404].

Nos résultats sont en ligne avec le nombre croissant d'articles pointant vers la dérégulation du système endosome-lysosome comme mécanisme potentiel sous-jacent de la MA [330, 424]. En outre, de nombreux facteurs de risque génétique pour la MA comme BIN1, PICALM, EPHA1, CD2AP, SORL1 et RIN3 sont impliqués dans le trafic intracellulaire [103] soutenant cette hypothèse. De plus, des anomalies endosomales ont été observées dans de nombreux modèles cellulaires humains de la MA [206, 211, 245, 261] et l'hypertrophie des endosomes représente l'un des premiers marqueurs cytopathologiques de la MA, survenant avant même l'apparition des plaques séniles ou des dégénérescences neurofibrillaires [65]. Les défauts endosomaux ont été liés à une suractivation de Rab5 [349] à la fois dans la MA et dans le SD. Comme la suractivation de Rab5 a déjà été décrite dans des modèles murins pour induire un dysfonctionnement endosomal similaire à celui observé dans la MA [350], nous avons montré chez la Drosophile que les effets spécifiques de BIN1iso1 sont également dépendants de Rab5. Il est important de noter qu'en plus d'être un régulateur majeur des endosomes précoces, la modulation de l'expression de Rab5 peut impacter le clivage de l'APP par la  $\beta$ -sécrétase pour produire l'APP  $\beta$ -CTF. En conséquence, toute altération du trafic intracellulaire est susceptible de perturber le métabolisme de l'APP. D'ailleurs, l'APP  $\beta$ -CTF est le médiateur des défauts endosomaux dans des Nhis mutants FAD [261], via l'activation de Rab5 par APPL1 [240]. Néanmoins, au cours de notre crible, nous avons constaté que la perte de APPL1, l'orthologue chez la Drosophile de l'APP, n'a pas permis de contrecarrer la dégénérescence neuronale induite par BIN1iso1, suggérant que l'APP  $\beta$ -CTF ne médie pas la toxicité induite par BIN1iso1. De façon intéressante, le rôle de l'APP  $\beta$ -CTF est sujet à débat puisque des études ont montré des résultats contradictoires concernant la médiation des défauts endosomaux par l'APP  $\beta$ -CTF dans des Nhis SORL1 KO [206, 245].

De surcroît, il a été montré que l'augmentation de RIN3, un membre de la famille des petites GTPases Rab5, associé à la MA [266], entraîne un dysfonctionnement endosomal par le biais de Rab5 [413] et RIN3 interagit avec BIN1 [223, 413]. Des investigations supplémentaires seraient pertinentes pour déterminer si RIN3 pourrait être un intermédiaire de la dégénérescence induite par BIN1iso1.

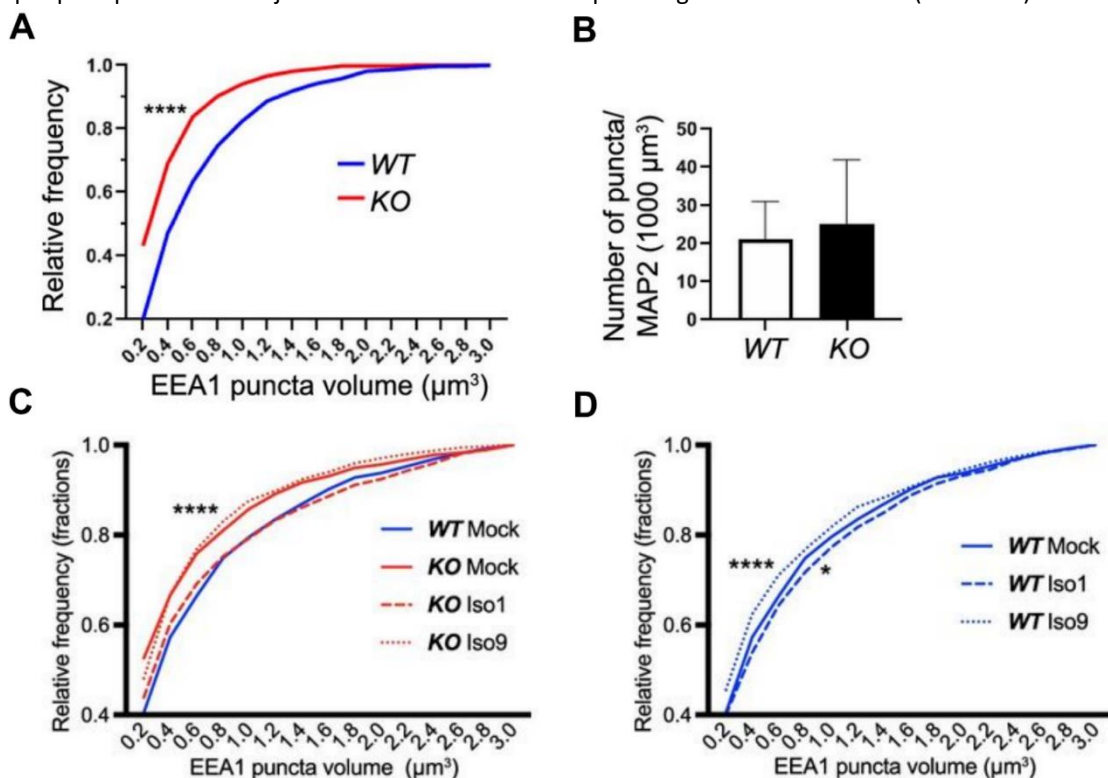
Pour finir, le fait que nos données indiquent que les défauts endosomaux et la toxicité induite par BIN1iso1 peuvent être atténués par un gain de fonction de Rab11, est en corrélation avec des données montrant une colocalisation de BIN1 avec Rab11 [404] indiquant que l'activité de Rab11 est altérée dans la MA en relation avec le trafic endosomal [51, 460, 488]. Dans l'ensemble, nos résultats soutiennent fortement un rôle de BIN1 dans le dérèglement endosomal observé dans la MA.

Le fait que la surexpression de BIN1 engendre non seulement un élargissement des endosomes mais aussi une dégénérescence neuronale, suggère qu'une augmentation de l'expression de BIN1 pourrait être délétère pour les neurones en contribuant aux phases précoces de la MA via une altération des endosomes précoces. Toutefois, à l'heure actuelle, le consensus autour de la dérégulation de l'expression de BIN1 et de l'impact des variants associés à la MA n'est pas clairement établi. Effectivement, la majorité des études montrant une altération de l'expression de BIN1 dans le cerveau de patients atteints de la MA se sont focalisées sur des échantillons obtenus à des stades tardifs de la pathologie [2, 70, 153–155, 194, 294, 389, 437]. De surcroît, aucune ne s'est intéressée à mesurer les niveaux des différentes isoformes de BIN1 dans les différentes populations cellulaires cérébrales dans les stades précoces de la MA. C'est pourquoi, il est actuellement impossible d'établir une causalité entre l'expression de BIN1 et la pathogenèse de la MA. Comme dit précédemment, BIN1 participe à divers processus cellulaires, ainsi, nous pouvons imaginer que les variations d'expression de BIN1 dans le cerveau au cours de la

MA puissent impacter la propagation de la pathologie au travers de mécanismes distincts, en fonction des types cellulaires cérébraux.

Un autre point intéressant à aborder est celui des SNPs de BIN1 associés à la MA. Comme évoqué dans l'introduction, aucun allèle codant n'a pu être répliqué et il existe plusieurs variants non-fonctionnels de BIN1 qui pourraient affecter l'expression de BIN1 dans le cerveau. Par exemple, le variant rs59335482, une mutation de type insertion, entraîne une augmentation in vitro des transcrits de BIN1 dans des cellules HEK et SH-SY5Y et dans le cerveau de patients touchés par la MA [70]. Toutefois, cette dernière étude n'a pas analysé les différentes isoformes de BIN1. De plus, deux autres variants, les rs6733839 et rs13025717, en en déséquilibre de liaison avec le rs59335482 se localisent dans une région enrichie en enhancers spécifiques de la microglie [83, 332]. Il a été montré, notamment, que la délétion d'une grande région promotrice de 363 pb contenant ces variants, a engendré une diminution de l'expression de BIN1 dans des cellules microgliales humaines induites mais pas dans des Nhis. La recherche concernant le rôle de BIN1 dans la MA par le spectre de l'effet transcriptionnel des variants est encore pauvre en études. De ce fait, il faut garder à l'esprit que l'impact des variants BIN1 dans la MA puisse dépendre de processus physiopathologiques spécifiques de la MA comme l'exposition à l'A $\beta$  ou à des oligomères de Tau. De ce fait, l'incertitude autour des variants fonctionnels de BIN1 reste entière. En outre, même si l'objectif était orienté sur la fonction des isoformes de BIN1 dans les neurones et non pas l'analyse de l'impact fonctionnel de SNPs de BIN1 sur la MA et que les fonctions des isoformes de BIN1 dans la MA sont à ce jour encore mal décrites, cette thèse peut fournir des éléments intéressants concernant le rôle de BIN1 dans la dérégulation de la taille et de la fonction des endosomes précoces. Entre autres, les polymorphismes de BIN1 ont été associés aux charges de Tau mais pas aux charges d'amyloïde dans le tissu cérébral post-mortem de la MA [9]. Par ailleurs, ils sont systématiquement associés à une accumulation plus rapide de Tau liée à l'A $\beta$  et au déclin cognitif chez les patients atteints de la MA [132, 133].

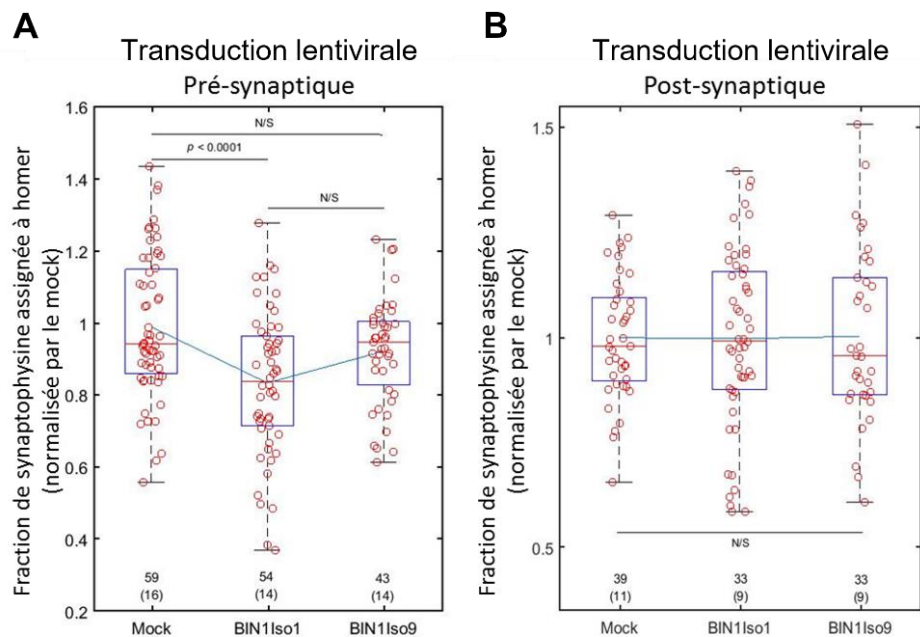
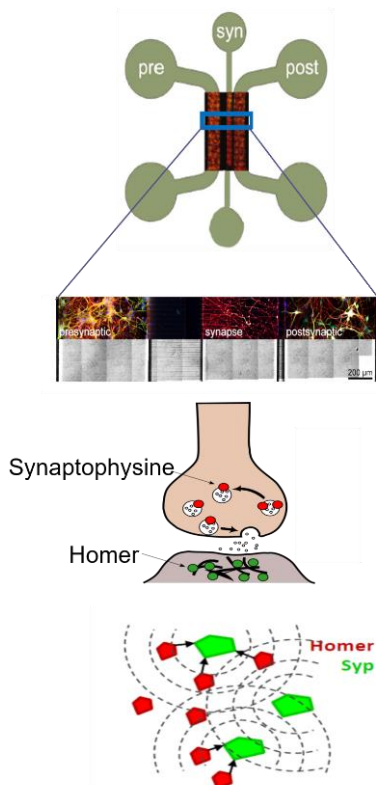
En conclusion, une augmentation de BIN1iso1 dans les neurones pourrait contribuer à la pathogenèse de la MA en augmentant la taille des endosomes précoces, qui sont observés au début de la pathogenèse de la MA en induisant une neurodégénérescence. Il a également été démontré que d'autres déterminants génétiques de la MA régulent la taille des endosomes précoces, ce qui confirme que les défauts des endosomes précoces constituent un événement majeur dans la pathogenèse de la MA. L'ensemble de ces résultats, chez la Drosophile et en Nhis, ont fait l'objet d'un manuscrit, dont je suis premier auteur, intitulé « The Alzheimer's disease genetic risk factor BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects ». L'article a été accepté pour publication en janvier 2022 chez Acta Neuropathologica Communications (Annexe 2).



**Figure 38 : Augmentation de la proportion des endosomes de petite taille dans les Nhis BIN1 KO et sauvetage du phénotype endosomal dans ces mutants par transduction de BIN1iso1.** (A) Graphique montrant la distribution cumulative du volume des endosomes précoces dans des Nhis. Ligne bleue : BIN1 sauvage, ligne rouge : BIN1 KO. N=3 cultures indépendantes, test Kolmogorov-Smirnov. (B) Quantification associée du nombre des endosomes précoces. (C) Graphique montrant la distribution cumulative du volume des endosomes précoces dans des Nhis BIN1 KO réexprimant BIN1iso1 ou BIN1iso9. Ligne pointillée rouge : BIN1iso1, ligne pointillée rouge : BIN1iso9, ligne bleue : mock, ligne rouge : mock KO BIN1. L'expression de BIN1iso1 dans les Nhis BIN1 KO permet de rétablir le phénotype sauvage. N=3 cultures indépendantes, test Kolmogorov-Smirnov. (D) Graphique montrant la distribution cumulative du volume des endosomes précoces dans des Nhis surexprimant BIN1iso1 et BIN1iso9. L'isoforme 1 engendre une augmentation des endosomes de plus grande taille. N=3 cultures indépendantes, test Kolmogorov-Smirnov.

## 2- BIN1 et synapse

Pour confirmer les résultats obtenus dans le modèle de JNM de larve 3ème stade de Drosophile, nous nous sommes demandé si l'impact observé de BIN1iso1 était conservé dans un modèle de mammifère et plus précisément dans un modèle de culture primaire de neurones corticaux de rats néonataux en système microfluidique, à l'aide du groupe du Dr Devrim Kilinc. Les dispositifs microfluidiques sont des appareils disposant de 3 chambres : une chambre pré synaptique, une chambre synaptique et une chambre post synaptique. Les chambres pré et post synaptiques, qui abritent les cellules corticales de rats néonataux, sont reliées à la chambre synaptique par des micro-canaux qui laissent passer les axones et dendrites pour le compartiment pré synaptique et seulement les dendrites pour le compartiment post synaptique. Nous avons ainsi testé l'impact de la surexpression de BIN1iso1 et BIN1iso9 sur la connectivité synaptique. Ce paramètre est évalué par la fraction de synaptophysine, un marqueur présynaptique, assigné aux points d'homer, un marqueur post-synaptique, les plus proches dans un rayon de 1µm à partir du point de synaptophysine. Nous avons pu observer que la surexpression de BIN1iso1 dans le compartiment présynaptique a provoqué une diminution du pourcentage d'assignement traduisant une perte de connectivité spécifique (Figure 39A). En revanche, la surexpression de BIN1iso9 n'a pas eu d'effet sur la connectivité synaptique (Figure 39A). Nous avons réitéré les expériences dans le compartiment post-synaptique et nous n'avons pas remarqué d'effet de la surexpression ni de BIN1iso1 ni de BIN1iso9 sur la connectivité synaptique (Figure 39B). En somme, nous avons pu montrer que l'expression de BIN1iso1 semblerait impacter la fonction synaptique au niveau du compartiment synaptique.



**Figure 39 : L'expression de BIN1iso1 induit une perte de connexion synaptique dans un modèle de culture primaire de neurone de rat cultivé en système microfluidique.** Quantification du pourcentage d'assignation de la synaptophysine (pré synaptique) à homer (post synaptique) en pré synaptique (a) et post synaptique (b). Mock = contrôle, BIN1iso1 = surexpression de BIN1iso1, BIN1iso9 = surexpression de BIN1iso9

Nos résultats indiquent un rôle direct de BIN1iso1 au cœur de la synapse soutenu par le fait que (i) l'expression de BIN1 a entraîné l'apparition de larges vésicules et des défauts de transmission synaptique dans les terminaisons synaptiques des neurones PRs (ii) l'expression de BIN1 a entraîné l'altération de la morphologie des JNMs (iii) Rab11 permet d'empêcher les défauts morphologiques induits par BIN1iso1 et (iv) la connectivité synaptique est modulée négativement par BIN1iso1 dans les cellules corticales de rats néonataux. Bien entendu, la taille aberrante des vésicules observées chez la Drosophile ou le phénotype particulier des JNMs peut s'expliquer par le fait d'exprimer une protéine humaine dans un système hétérologue, entraînant ainsi des phénotypes plus marqués. Toutefois, cela peut être réfuté par le fait que la surexpression de BIN1iso8 et de BIN1iso9 n'entraîne ni l'apparition de vésicules de grande taille, ni défauts électrophysiologiques, ni l'altération de la morphologie des JNMs.

La MA est associée à une perte précoce des synapses et de la fonction synaptique, ainsi qu'une perte neuronale. Dans le but de modéliser la maladie et identifier des mécanismes impliqués dans la pathogenèse de la MA, les modèles animaux sont essentiels et doivent montrer des symptômes et comportements similaires à ceux observés chez les patients souffrant de cette pathologie. A cet effet, la Drosophile est un excellent modèle d'études invertébrés pour étudier les maladies neurodégénératives humaines telles que la MA [41, 67, 138, 214, 305, 476]. Etant donné que la MA est une pathologie présentant une dysfonction synaptique, nous avons analysé la morphologie des JNMs glutamatergiques pour décortiquer l'impact de l'expression de BIN1iso1 sur la synapse. A ce sujet, la JNM de larve 3<sup>ème</sup> stade de Drosophile est un modèle d'étude à la morphologie simple et conservée, bien caractérisé physiologiquement et accessible en termes d'utilisation [80, 303, 405]. De surcroît, à l'instar des synapses excitatrices du système nerveux central (SNC) des vertébrés, la JNM de Drosophile repose sur une communication glutamatergique [247], faisant de la JNM un modèle adapté à l'étude de la synapse malgré les critiques concernant le fait que la JNM soit une synapse entre un motoneurone et une cellule musculaire.

De plus, l'expansion de la JNM de larve de Drosophile se produit par l'ajout de nouveaux boutons dépendant des signalisation Wnt/Wg [20] et BMP [32, 355]. Les modes d'ajout possibles de boutons synaptiques comprennent le bourgeonnement asymétrique, similaire à la division cellulaire de la levure, la division symétrique des boutons ou la formation de novo à partir de l'axe de l'axone [512]. Outre l'ajout de boutons, l'élimination ou le raffinement des boutons synaptiques est également essentiel pour affiner la structure synaptique et prévenir une croissance excessive [394, 462]. En outre, il est vrai qu'au cours de la morphogenèse de la larve en Drosophile adulte, les neurones "larvaires" subissent un raffinement stéréotypé pour reconstruire des circuits neuronaux spécifiques à l'adulte [82, 226, 455]. Ces processus concernent surtout les neurones du système nerveux périphérique (SNP) [259, 483] mais il existe de tels mécanismes dans le SNC, notamment au niveau des neurones des corps pédonculés, homologues fonctionnels de l'hippocampe [273]. Concernant les motoneurones des JNMs, il a été montré qu'ils se rétractaient au cours de la métamorphose [42, 43, 285], bien que cette affirmation ait été remise en cause par une étude récente qui soutient que ce raffinement s'effectue par dégénérescence de motoneurones environ 22h après la formation de la nymphe [492], excluant de facto que l'effet de BIN1iso1 sur la morphologie de JNMs soit la conséquence de son impact sur le processus de raffinement puisque nous utilisons des larves de 3<sup>ème</sup> stade.

Il est intéressant de penser que l'effet de BIN1 sur les JNMs pourrait provenir de ses fonctions dans le remodelage membranaire, l'endocytose et le trafic intracellulaire, en affectant le développement et la croissance des JNMs et/ou l'organisation et le fonctionnement des compartiments pré- ou post-synaptiques. Nous pouvons alors supposer que la surexpression de BIN1iso1 pourrait altérer le trafic et la fusion des vésicules synaptiques, expliquant les défauts électrophysiologiques observés dans les neurones PRs et les modifications



morphologiques observées dans les JNMs. Dans ce contexte, l'expression de Rab11 viendrait soulager le blocage causé par BIN1iso1 en améliorant le trafic des vésicules synaptiques, expliquant l'effet de sauvetage partiel de Rab11 dans les JNMs exprimant BIN1.

Par ailleurs, il est également important de noter que des défauts de l'endocytose peuvent être à l'origine d'une croissance excessive des synapses et d'une altération de l'organisation des protéines synaptiques [21, 319, 337, 355, 415]. De même, les voies endocytiques et endosomales sont essentielles pour contrôler à la fois l'activité et la localisation des protéines de signalisation qui régulent la croissance synaptique [86, 382]. Des défauts dans le trafic intracellulaire peuvent également conduire à une signalisation accrue des compartiments cellulaires (comme les endosomes), affectant le développement des synapses [109, 127, 382, 436]. Dans ce contexte, une étude a montré de façon intéressante, que des mutants de la protéine adaptatrice AP-2 ont pour effet l'accumulation de larges vésicules apparentées à des endosomes au niveau des JNMs chez la Drosophile [74]. Dans cette même étude, il a été trouvé que les niveaux de Rab11 étaient significativement réduits. Toutefois, contrairement au sauvetage partiel que nous avons observé, l'expression de Rab11 n'a pas permis de rétablir les défauts synaptiques [74].

De plus, des études s'accordent pour affirmer que la perte de dAmph n'a pas d'impact sur la structure de la JNM en termes de nombre de boutons synaptiques et de branches [278, 504], ce qui concorde avec nos résultats puisque nous n'avons pas noté d'effet lors de la surexpression de dAmphA. D'autres études suggèrent au contraire, que la délétion de dAmph engendre une diminution du nombre de boutons synaptiques [295]. Il semblerait au demeurant que dAmph se localise dans le compartiment post-synaptique [250, 278, 295, 504], ce qui pourrait expliquer le manque d'effet de la délétion de dAmph sur la structure des boutons synaptiques observé dans certaines études. Toutefois, ces études évoquent le fait que dAmph pourrait également se localiser dans le compartiment présynaptique mais qu'elle serait présente en trop faible quantité pour être détectée en immunofluorescence. Il a d'ailleurs été montré que dAmph, dans le compartiment présynaptique aurait rôle préférentiellement au niveau du trafic et de l'exocytose des vésicules synaptiques mais pas au niveau de leur recyclage par endocytose [278, 504], expliquant hypothétiquement que la surexpression de BIN1iso1 pourrait perturber cette signalisation, résultant en l'accumulation de vésicules de grande taille et en altérant la physiologie de la JNM. A ce propos, il semblerait qu'il n'y ait peu voire pas de conséquence de la perte de dAmph sur les courants excitateurs chez la larve de Drosophile [278, 504], ce qui est plutôt cohérent avec le fait que nous ne détectons pas d'altérations électrophysiologiques chez des mouches âgées de 1 jour. De surcroît cela amène une piste de réflexion quant à l'absence de modification du nombre de zones actives lors de la surexpression de BIN1iso1. Effectivement, chaque site de libération de neurotransmetteur ou zone active, nécessite l'assemblage et le maintien coordonnés de multiples complexes protéiques de part et d'autre de la JNM pour la libération des vésicules synaptiques. Bien que nous ayons montré que BIN1iso1 ne perturbait pas le nombre de zones actives, nous ne pouvons pas exclure que les vésicules synaptiques soient non fonctionnelles ni même que leur adressage soit incorrect ou encore que leur exocytose se déroule anormalement. Pour l'heure, il est encore trop tôt pour conclure d'un effet de BIN1iso1 sur la physiologie de la JNM.

L'effet de BIN1iso1 au niveau synaptique pourrait également être étroitement lié aux processus physiopathologiques spécifiques de la MA comme le métabolisme de l'APP ou à des oligomères de Tau. A ce propos, il a été montré que la surexpression de l'orthologue de l'APP chez la Drosophile avait pour conséquence de déréguler le transport axonal et d'entraîner une augmentation du nombre de boutons synaptiques au niveau de la JNM [451]. De même, il a été montré que l'APP engendre des défauts synaptiques reflétés par une diminution de l'activité locomotrice des larves de Drosophile et une altération de la formation synaptique traduite par une diminution du nombre de boutons synaptiques [306]. Pour rappel, l'APP  $\beta$ -CTF est le médiateur des défauts endosomaux dans des Nhis mutants FAD, via l'activation de Rab5 par APPL1. La modulation de l'APPL dans les études citées précédemment, entraîne des défauts morphologiques semblables à ceux produits par la surexpression de BIN1iso1, suggérant, contrairement à nos observations dans les neurones PRs, que l'APP  $\beta$ -CTF

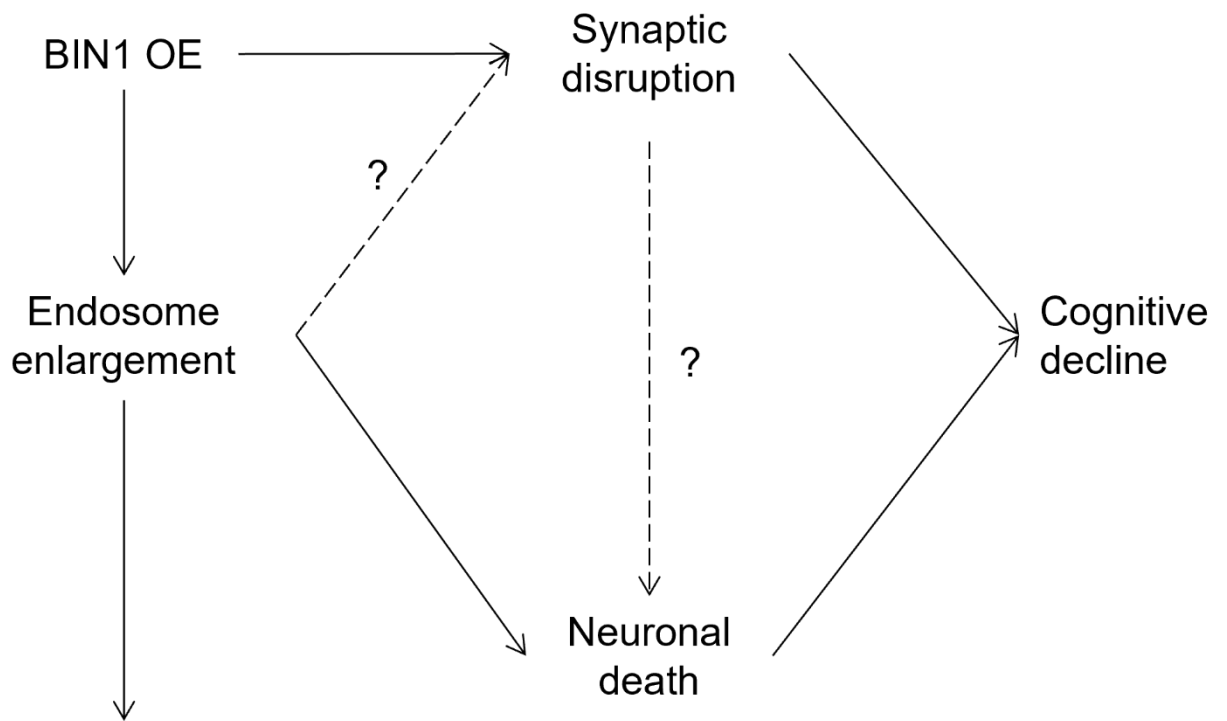
pourrait médier la toxicité induite par BIN1 à la JNM. Une autre étude a montré, chez la Drosophile, que l'Aβ40 engendre une légère réduction du nombre de synapses, tandis que l'Aβ42 provoque une perte synaptique nette [286].

De plus, il a été montré que la surexpression de la protéine Tau humaine ON3R engendre des défauts du transport axonal ainsi que des altérations morphologiques et physiologiques des JNMs [72]. Notamment, les JNMs sont de taille réduite et affichent une structure anormale mais restent malgré tout capable de former des ZAs [72] mais présentent des défauts de la transmission synaptique et une altération du trafic vésiculaire [72]. Par ailleurs, il a été montré que GSK3β, un des régulateur clé de la phosphorylation de Tau, médie les effets synaptotoxiques de Tau chez la Drosophile [468]. De surcroit, l'Aβ est capable d'exacerber les défauts synaptiques provoqués par l'expression de Tau dans les JNMs de Drosophile.

Plusieurs études menées sur des cultures cellulaires de vertébrés ont abordé la question du rôle de BIN1 au niveau synaptique. Contrairement aux études menées sur la Drosophile, celles sur des modèles mammifères sont sujet à plus de controverse. Entre autres, l'équipe de Schurmann est en faveur d'une localisation post-synaptique de BIN1 [404], tandis que l'équipe de De Rossi est en faveur d'une localisation présynaptique [390], bien que toutes deux n'excluent pas que BIN1 puisse également se trouver dans l'autre compartiment que celui qu'elles soutiennent respectivement. De plus, il semble que la perte de BIN1 ait pour effet une perte de la densité synaptique [390] alors que de notre côté, nous avons montré que la surexpression de BIN1iso1 entraînait une diminution de la connectivité synaptique. Ces différences pourraient trouver leurs origines dans les méthodes utilisées et le paramètre quantifié pour refléter la connectivité synaptique. Toutefois, les dispositifs microfluidiques semblent être l'outil le plus adéquat pour l'étude de la densité synaptique. De plus il a pu être montré que la délétion de BIN1 entraîne une diminution des courants excitateurs médiés par les récepteurs AMPA alors que la surexpression de BIN1 cause une augmentation des courants excitateurs médiés par les récepteurs AMPA [404], ce qui pourrait peut-être traduire une altération de la transmission synaptique et/ou une excitotoxicité. Une autre étude a montré que la perte de fonction de BIN1 dans des Nhis entraîne des altérations transcriptionnelles spécifiques dans les neurones glutamatergiques, impliquant principalement des gènes associés à l'homéostasie du calcium, au transport des ions et à la fonction des synapses [396]. BIN1 régule les courants calciques transitoires et l'activité électrique neuronale par le biais d'une interaction avec le canal calcique de type L Cav1.2 et d'une régulation de l'internalisation de ce canal en fonction de son activité [396]. La délétion de BIN1 dans les Nhis entraîne des altérations électriques neuronales qui peuvent être partiellement atténuées par un traitement à la nifédipine, un antagoniste de Cav1.2 [396]. Ces résultats sont cohérents avec nos données d'électrophysiologie pour lesquelles BIN1iso1 cause une perte des paramètres d'ERG dans les neurones PRs.

En conclusion, une augmentation de BIN1iso1 dans les JNMs pourrait contribuer à la pathogenèse de la MA en participant aux défauts synaptiques au début de la pathogenèse de la MA.

L'ensemble de ces résultats, chez la Drosophile et en culture primaire de neurones corticaux de rats néonataux, devrait faire l'objet d'une publication prochainement.



## Acta Neuropathologica Communications

Home About [Articles](#) Collections [Submission Guidelines](#)

Research | [Open Access](#) | [Published: 08 January 2022](#)

### The Alzheimer susceptibility gene *BIN1* induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects

[Erwan Lambert](#), [Orthis Saha](#), [Bruna Soares Landeira](#), [Ana Raquel Melo de Farias](#), [Xavier Hermant](#), [Arnaud Carrier](#), [Alexandre Pelletier](#), [Johanna Gadaut](#), [Lindsay Davoine](#), [Cloé Dupont](#), [Philippe Amouyel](#), [Amélie Bonnefond](#), [Frank Lafont](#), [Farida Abdelfettah](#), [Patrik Verstreken](#), [Julien Chapuis](#), [Nicolas Barois](#), [Fabien Delahaye](#), [Bart Dermaut](#), [Jean-Charles Lambert](#), [Marcos R. Costa](#) & [Pierre Dourlen](#)

[Acta Neuropathologica Communications](#) **10**, Article number: 4 (2022) | [Cite this article](#)

3029 Accesses | 21 Altmetric | [Metrics](#)

**Figure 40 : Schéma bilan récapitulatif.** La surexpression de BIN1 entraîne un élargissement des endosomes et une défaillance synaptique qui vont engendrer une perte neuronale contribuant au déclin cognitif progressif



# Perspectives



## 1- BIN1 et endosomes

L'étude du rôle et de la toxicité neuronale des isoformes de BIN1 présente diverses perspectives permettant d'approfondir et de mieux comprendre les résultats obtenus.

Pour vérifier si des défauts du trafic intracellulaire étaient responsables de la toxicité induite par BIN1, nous avons réalisé un criblage de régulateurs des différents organites de la voie endosome-lysosome. Bien que nous ayons pu montrer que la surexpression de Rab5 et Rab11, régulateurs des endosomes précoces et des endosomes tardifs, respectivement, permettait d'inhiber la neurotoxicité induite par BIN1iso1 et donc confirmer notre hypothèse, une certaine proportion de nos résultats était intéressante mais ne nous permettait pas de statuer quant à l'implication de quelques régulateurs. C'est pourquoi, il pourrait être pertinent d'étoffer ces résultats en testant des constructions transgéniques supplémentaires et/ou des interactions entre les régulateurs testés et BIN1, par exemple pour la synaptojanine dont la surexpression a été associée à un élargissement des endosomes dans des cellules de neuroblastome ainsi que dans un modèle de souris transgéniques portant une copie additionnelle du gène de la synaptojanine [87, 309]. Du côté des Nhis, il aurait pu être pertinent de déterminer si Rab5 et Rab11 sont aussi capables de prévenir la toxicité induite par BIN1iso1, à l'instar de ce que nous avons observé dans le modèle de neurones PRs.

Nous avons pu observer que la dégénérescence induite par BIN1 se caractérisait par l'accumulation de grosses vésicules positives pour des marqueurs endosomaux. Sachant que l'élargissement des endosomes précoces est l'un des premiers marqueurs cytopathologiques de la MA, il aurait été intéressant de visualiser et de quantifier la taille des endosomes dans le cerveau de patients possédant un (ou plusieurs) variant(s) de BIN1 associé(s) à la MA, d'autant plus que la grande majorité des études utilisent des échantillons de patients âgés avec un stade avancé de MA. Dans la même optique, il aurait été intéressant d'analyser par microscopie électronique si l'augmentation de la taille des vésicules induites par BIN1iso1 pouvait être prévenue par l'expression de Rab5 et Rab11

Pour tenter d'identifier un partenaire d'interaction de BIN1iso1, nous avons réalisé des expériences de co-immunoprécipitation. Toutefois, nous n'avons pu identifier que 2 partenaires dont l'un était déjà connu. Cela peut résulter d'un manque de sensibilité et/ou de détection. Pour pallier à ce problème, il faudrait sans doute augmenter le nombre de Drosophiles utilisées pour l'extraction protéique. Pour rappel, nous avons utilisé 200 Drosophiles pour préparer les échantillons, de ce fait, pour augmenter nos chances de détecter un partenaire d'interaction, il faudrait sans doute utiliser 500 voire 1000 Drosophiles, ce qui constitue un challenge en termes d'élevage et pour la préparation des échantillons. Dans l'éventualité où nous identifions un partenaire d'interaction chez la Drosophile, nous pourrions tenter de confirmer cette interaction via des expériences de PLA (Proximity Ligation Assay) dans des modèles cellulaires mammifères. Il aurait pu être également intéressant d'utiliser directement des modèles animaux pour disposer d'échantillons plus importants pour identifier un partenaire d'interaction de BIN1.

De plus, il a été déterminé que la calcineurine déphosphorylait BIN1 sur un site de phosphorylation en thréonine 348, favorisant la conformation ouverte de l'isoforme neuronale de BIN1. La phosphorylation de ce site a notamment augmenté la disponibilité du domaine SH3 de BIN1 pour l'interaction avec Tau [400]. De ce fait, l'ouverture conformationnelle peut potentiellement impacter les fonctions de BIN1 et ses interactions avec d'autres protéines. Dans ce contexte, nous avons commencé à générer des plasmides contenant soit un mutant phosphomimétique (BIN1 T348E) soit un mutant phosphodéficient de BIN1iso1 (BIN1 T348A) afin de produire les Drosophiles transgéniques correspondantes. Toutefois, cette expérience a été mise de côté au profit de l'étude du rôle de BIN1 au niveau synaptique mais il serait toujours très intéressant de poursuivre ce projet.

## 2- BIN1 et synapse

L'étude de l'impact de l'expression de BIN1 et de ses isoformes présente diverses perspectives permettant d'approfondir et de mieux comprendre les résultats obtenus.

Dans le modèle des neurones PRs, nous avons observé une forte accumulation de vésicules de grande taille dans les corps cellulaires et les terminaisons synaptiques. De ce fait, il pourrait être pertinent de connaître si ces vésicules sont aussi retrouvées dans les JNMs.

A l'instar de ce que nous avons réalisé en microfluidique, il pourrait être intéressant de vérifier l'effet de BIN1 et de ses isoformes dans le compartiment post-synaptique des JNMs. Concernant, les expériences de sauvetage, au-delà de Rab11, il serait pertinent d'analyser l'effet de l'expression de Rab5 sur les défauts morphologiques des JNMs induits par BIN1iso1. Tout comme les expériences de neutralisation de la cornée, il serait intéressant de tester les constructions constitutivement active et dominante-négative de Rab5 et Rab11 pour tenter d'identifier un mécanisme potentiellement commun à celui de la neurotoxicité de BIN1 dans les neurones PRs. Enfin étant donné que le domaine CLAP est nécessaire à la dégénérescence induite par BIN1iso1, il pourrait être intéressant de tester l'impact de la forme tronquée de BIN1iso1 pour le domaine CLAP sur la morphologie des JNMs.

Étant donné les changements morphologiques induits par la surexpression de BIN1iso1, nous nous sommes demandé si les JNMs présentaient une altération de leur physiologie. Pour explorer cet aspect, nous avons cherché à quantifier le nombre de zones actives. Toutefois, nous avons observé que le nombre moyen de zones actives demeurait inchangé. Malgré tout, cela ne signifie en rien que la fonctionnalité de la JNM n'est pas impactée par les altérations morphologiques. Effectivement, il a été montré, par exemple, que l'expression de l'APP humain augmentait le nombre de boutons synaptiques et ne faisait pas varier le nombre moyen de zones actives. En revanche, le nombre de zones actives par bouton avait chuté et ces perturbations étaient accompagnées d'une diminution de la fréquence des potentiels de jonction excitateurs miniatures sans des courants spontanées [395]. De ce fait, il serait intéressant d'évaluer le nombre de zones actives par boutons et de réaliser des expériences d'électrophysiologies pour mesurer les courants spontanées et induits. Il serait également pertinent d'évaluer par microscopie électronique si les zones actives possèdent un pool de vésicules synaptiques identiques à des JNMs sauvages, ainsi que de vérifier leur contenu et également mesurer la synchronicité du relargage des vésicules. A cet effet, il existe une méthode récente, le Neuropeptide Release Reporter (NPRR) qui a été récemment introduit comme un nouvel indicateur codé génétiquement de la libération de neuropeptides avec une haute résolution temporelle et une spécificité peptidique basée sur la molécule GcaMP [174], qui mériterait d'être essayée. Si nous avons des défauts électrophysiologiques, il serait ensuite intéressant de mesurer les niveaux des récepteurs au glutamate, importants dans la plasticité synaptique

D'un point de vue comportemental, il serait bon de réaliser des tests de "crawling" pour déceler si les larves surexpriment BIN1iso1 présentent des défauts locomoteurs. Il pourrait également être intéressant de réaliser des tests de "climbing" chez les individus adultes ainsi que des tests de mémoire et d'apprentissage.

Enfin, il serait bon d'évaluer l'impact de la modulation de l'A $\beta$  et de Tau sur la morphologie des JNMs et sur la toxicité synaptique induite par BIN1.





# Bibliographie



1. Van Acker ZP, Bretou M, Annaert W (2019) Endo-lysosomal dysregulations and late-onset Alzheimer's disease: Impact of genetic risk factors. *Mol Neurodegener* 14
2. Adams SL, Tilton K, Kozubek JA, Seshadri S, Delalle I (2016) Subcellular changes in bridging integrator 1 protein expression in the cerebral cortex during the progression of Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 75:779–790. doi: 10.1093/jnen/nlw056
3. Agostinho P, Pliássova A, Oliveira CR, Cunha RA (2015) Localization and Trafficking of Amyloid- $\beta$  Protein Precursor and Secretases: Impact on Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 45:329–47. doi: 10.3233/JAD-142730
4. Aikawa T, Holm M-L, Kanekiyo T (2018) ABCA7 and Pathogenic Pathways of Alzheimer's Disease. *Brain Sci* 8:27. doi: 10.3390/brainsci8020027
5. Alzheimer A (1907) Alzheimer 1907. *Allgemeine Zeitschrift fur Psychiatrie und Psychisch-gerichtliche Medizin* 64:146–8
6. Alzheimer Association (2023) 2023 Alzheimer's disease facts and figures. *Alzheimer's & Dementia*. doi: 10.1002/alz.13016
7. Alzheimer Europe (2019) Dementia in Europe Yearbook 2019 : Estimating the prevalence of dementia in Europe
8. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, von Arnim CAF, Breiderhoff T, Jansen P, Wu X, Bales KR, Cappai R, Masters CL, Gliemann J, Mufson EJ, Hyman BT, Paul SM, Nykjær A, Willnow TE (2005) Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:13461–13466. doi: 10.1073/pnas.0503689102
9. Andersen OM, Rudolph I-M, Willnow TE (2016) Risk factor SORL1: from genetic association to functional validation in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol* 132:653–665. doi: 10.1007/s00401-016-1615-4
10. Ando K, Brion J-P, Stygelbout V, Suain V, Authélet M, Dedecker R, Chanut A, Lacor P, Lavaur J, Sazdovitch V, Rogaeva E, Potier M-C, Duyckaerts C (2013) Clathrin adaptor CALM/PICALM is associated with neurofibrillary tangles and is cleaved in Alzheimer's brains. *Acta Neuropathol* 125:861–878. doi: 10.1007/s00401-013-1111-z
11. Ando K, Tomimura K, Sazdovitch V, Suain V, Yilmaz Z, Authélet M, Ndjim M, Vergara C, Belkouch M, Potier M-C, Duyckaerts C, Brion J-P (2016) Level of PICALM, a key component of clathrin-mediated endocytosis, is correlated with levels of phosphotau and autophagy-related proteins and is associated with tau inclusions in AD, PSP and Pick disease. *Neurobiol Dis* 94:32–43. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.017
12. Andreadis A (2005) Tau gene alternative splicing: expression patterns, regulation and modulation of function in normal brain and neurodegenerative diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1739:91–103. doi: 10.1016/j.bbadis.2004.08.010
13. Andrew RJ, De Rossi P, Nguyen P, Kowalski HR, Recupero AJ, Guerbet T, Krause S V., Rice RC, Laury-Kleintop L, Wagner SL, Thinakaran G (2019) Reduction of the expression of the late-onset Alzheimer's disease (AD) risk-factor BIN1 does not affect amyloid pathology in an AD mouse model. *Journal of Biological Chemistry* jbc.RA118.006379. doi: 10.1074/jbc.ra118.006379
14. Anggono V, Smillie KJ, Graham ME, Valova VA, Cousin MA, Robinson PJ (2006) Syndapin I is the phosphorylation-regulated dynamin I partner in synaptic vesicle endocytosis. *Nat Neurosci* 9:752–760. doi: 10.1038/nn1695
15. Aoyagi A, Condello C, Stöhr J, Yue W, Rivera BM, Lee JC, Woerman AL, Halliday G, van Duinen S, Ingelsson M, Lannfelt L, Graff C, Bird TD, Keene CD, Seeley WW, DeGrado WF, Prusiner SB (2019) A $\beta$  and tau prion-like activities decline with longevity in the Alzheimer's disease human brain. *Sci Transl Med* 11. doi: 10.1126/scitranslmed.aat8462
16. Arias AM (2008) *Drosophila melanogaster and the Development of Biology in the 20th Century*. pp 1–25
17. Armstrong RA (2011) The Pathogenesis of Alzheimer's Disease: A Reevaluation of the "Amyloid Cascade Hypothesis." *Int J Alzheimers Dis* 2011:1–6. doi: 10.4061/2011/630865

18. Arriagada P V., Growdon JH, Hedley-Whyte ET, Hyman BT (1992) Neurofibrillary tangles but not senile plaques parallel duration and severity of Alzheimer's disease. *Neurology* 42:631–631. doi: 10.1212/WNL.42.3.631
19. Asimaki A (2012) BIN1: A new biomarker to track ARVC? *Heart Rhythm* 9:968–969. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.02.025
20. Ataman B, Ashley J, Gorczyca M, Ramachandran P, Fouquet W, Sigrist SJ, Budnik V (2008) Rapid Activity-Dependent Modifications in Synaptic Structure and Function Require Bidirectional Wnt Signaling. *Neuron* 57:705–718. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.026
21. Ball RW, Warren-Paquin M, Tsurudome K, Liao EH, Elazzouzi F, Cavanagh C, An B-S, Wang T-T, White JH, Haghighi AP (2010) Retrograde BMP Signaling Controls Synaptic Growth at the NMJ by Regulating Trio Expression in Motor Neurons. *Neuron* 66:536–549. doi: 10.1016/j.neuron.2010.04.011
22. Barral S, Bird T, Goate A, Farlow MR, Diaz-Arrastia R, Bennett DA, Graff-Radford N, Boeve BF, Sweet RA, Stern Y, Wilson RS, Foroud T, Ott J, Mayeux R (2012) Genotype patterns at PICALM, CR1, BIN1, CLU, and APOE genes are associated with episodic memory. *Neurology* 78:1464–1471. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182553c48
23. Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M (2006) Secretion of Wnt Ligands Requires Evi, a Conserved Transmembrane Protein. *Cell* 125:523–533. doi: 10.1016/j.cell.2006.04.009
24. Bate Michael, MartinezArias A (1993) *The development of drosophila melanogaster*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Plainview, N.Y
25. Bauer F, Urdaci M, Aigle M, Crouzet M (1993) Alteration of a yeast SH3 protein leads to conditional viability with defects in cytoskeletal and budding patterns. *Mol Cell Biol* 13:5070–5084. doi: 10.1128/mcb.13.8.5070-5084.1993
26. Bauerfeind R, Takei K, De Camilli P (1997) Amphiphysin I Is Associated with Coated Endocytic Intermediates and Undergoes Stimulation-dependent Dephosphorylation in Nerve Terminals. *Journal of Biological Chemistry* 272:30984–30992. doi: 10.1074/jbc.272.49.30984
27. van der Beek J, Jonker C, van der Welle R, Liv N, Klumperman J (2019) CORVET, CHEVI and HOPS – multisubunit tethers of the endo-lysosomal system in health and disease. *J Cell Sci* 132. doi: 10.1242/jcs.189134
28. Bellen HJ, Tong C, Tsuda H (2010) 100 years of *Drosophila* research and its impact on vertebrate neuroscience: a history lesson for the future. *Nat Rev Neurosci* 11:514–522. doi: 10.1038/nrn2839
29. Bellenguez C, Küçükali F, Jansen IE, Kleindam L, Moreno-Grau S, Amin N, Naj AC, Campos-Martin R, Grenier-Boley B, Andrade V, Holmans PA, Boland A, Damotte V, van der Lee SJ, Costa MR, Kuulasmaa T, Yang Q, de Rojas I, Bis JC, Yaqub A, Prokic I, Chapuis J, Ahmad S, Giedraitis V, Aarsland D, Garcia-Gonzalez P, Abdelnour C, Alarcón-Martín E, Alcolea D, Alegret M, Alvarez I, Álvarez V, Armstrong NJ, Tsolaki A, Antúnez C, Appollonio I, Arcaro M, Archetti S, Pastor AA, Arosio B, Athanasiu L, Bailly H, Banaj N, Baquero M, Barral S, Beiser A, Pastor AB, Below JE, Benček P, Benussi L, Berr C, Besse C, Bessi V, Binetti G, Bizarro A, Blesa R, Boada M, Boerwinkle E, Borroni B, Boschi S, Bossù P, Bråthen G, Bressler J, Bresner C, Brodaty H, Brookes KJ, Brusco LI, Buiza-Rueda D, Bürger K, Burholt V, Bush WS, Calero M, Cantwell LB, Chene G, Chung J, Cuccaro ML, Carracedo Á, Cecchetti R, Cervera-Carles L, Charbonnier C, Chen H-H, Chillotti C, Ciccone S, Claassen JAHR, Clark C, Conti E, Corma-Gómez A, Costantini E, Custodero C, Daian D, Dalmaso MC, Daniele A, Dardiotis E, Dartigues J-F, de Deyn PP, de Paiva Lopes K, de Witte LD, Debette S, Deckert J, del Ser T, Denning N, DeStefano A, Dichgans M, Diehl-Schmid J, Diez-Fairen M, Rossi PD, Djurovic S, Duron E, Düzel E, Dufouil C, Eiriksdottir G, Engelborghs S, Escott-Price V, Espinosa A, Ewers M, Faber KM, Fabrizio T, Nielsen SF, Fardo DW, Farotti L, Fenoglio C, Fernández-Fuertes M, Ferrari R, Ferreira CB, Ferri E, Fin B, Fischer P, Fladby T, Fließbach K, Fongang B, Fornage M, Fortea J, Foroud TM, Fostinelli S, Fox NC, Franco-Macías E, Bullido MJ, Frank-García A, Froelich L, Fulton-Howard B, Galimberti D, García-Alberca JM, García-González P, Garcia-Madrone S, Garcia-Ribas G, Ghidoni R, Giegling I, Giorgio G, Goate AM, Goldhardt O, Gomez-Fonseca D, González-Pérez A, Graff C, Grande G, Green E, Grimmer T, Grünblatt E, Grunin M, Gudnason V, Guetta-Baranes T, Haapasalo A, Hadjigeorgiou G, Haines JL, Hamilton-Nelson KL,

Hampel H, Hanon O, Hardy J, Hartmann AM, Hausner L, Harwood J, Heilmann-Heimbach S, Helisalimi S, Heneka MT, Hernández I, Herrmann MJ, Hoffmann P, Holmes C, Holstege H, Vilas RH, Hulsman M, Humphrey J, Biessels GJ, Jian X, Johansson C, Jun GR, Kastumata Y, Kauwe J, Kehoe PG, Kilander L, Ståhlbom AK, Kivipelto M, Koivisto A, Kornhuber J, Kosmidis MH, Kukull WA, Kuksa PP, Kunkle BW, Kuzma AB, Lage C, Laukka EJ, Launer L, Lauria A, Lee C-Y, Lehtisalo J, Lerch O, Lleó A, Longstreth W, Lopez O, de Munain AL, Love S, Löwemark M, Luckcuck L, Lunetta KL, Ma Y, Macías J, MacLeod CA, Maier W, Mangialasche F, Spallazzi M, Marquié M, Marshall R, Martin ER, Montes AM, Rodríguez CM, Masullo C, Mayeux R, Mead S, Mecocci P, Medina M, Meggy A, Mehrabian S, Mendoza S, Menéndez-González M, Mir P, Moebus S, Mol M, Molina-Porcel L, Montreal L, Morelli L, Moreno F, Morgan K, Mosley T, Nöthen MM, Muchnik C, Mukherjee S, Nacmias B, Ngandu T, Nicolas G, Nordestgaard BG, Olaso R, Orellana A, Orsini M, Ortega G, Padovani A, Paolo C, Papenberg G, Parnetti L, Pasquier F, Pastor P, Peloso G, Pérez-Cordón A, Pérez-Tur J, Pericard P, Peters O, Pijnenburg YAL, Pineda JA, Piñol-Ripoll G, Pisanu C, Polak T, Popp J, Posthuma D, Priller J, Puerta R, Quenez O, Quintela I, Thomassen JQ, Rábano A, Rainero I, Rajabli F, Ramakers I, Real LM, Reinders MJT, Reitz C, Reyes-Dumeyer D, Ridge P, Riedel-Heller S, Riederer P, Roberto N, Rodriguez-Rodriguez E, Rongve A, Allende IR, Rosende-Roca M, Royo JL, Rubino E, Rujescu D, Sáez ME, Sakka P, Saltvedt I, Sanabria Á, Sánchez-Arjona MB, Sanchez-Garcia F, Juan PS, Sánchez-Valle R, Sando SB, Sarnowski C, Satizabal CL, Scamosci M, Scarmeas N, Scarpini E, Scheltens P, Scherbaum N, Scherer M, Schmid M, Schneider A, Schott JM, Selbæk G, Seripa D, Serrano M, Sha J, Shadrin AA, Skrobot O, Slifer S, Snijders GJL, Soinen H, Solfrizzi V, Solomon A, Song Y, Sorbi S, Sotolongo-Grau O, Spalletta G, Spottke A, Squassina A, Stordal E, Tartan JP, Tárraga L, Tesí N, Thalamuthu A, Thomas T, Tosto G, Traykov L, Tremolizzo L, Tybjærg-Hansen A, Uitterlinden A, Ullgren A, Ulstein I, Valero S, Valladares O, Broeckhoven C Van, Vance J, Vardarajan BN, van der Lugt A, Dongen J Van, van Rooij J, van Swieten J, Vandenberghe R, Verhey F, Vidal J-S, Vogelgsang J, Vyhnaek M, Wagner M, Wallon D, Wang L-S, Wang R, Weinhold L, Wiltfang J, Windle G, Woods B, Yannakoulia M, Zare H, Zhao Y, Zhang X, Zhu C, Zulaica M, Laczó J, Matoska V, Serpente M, Assogna F, Piras F, Piras F, Ciuullo V, Shofany J, Ferrarese C, Andreoni S, Sala G, Zoia CP, Zompo M Del, Benussi A, Bastiani P, Takalo M, Natunen T, Laatikainen T, Tuomilehto J, Antikainen R, Strandberg T, Lindström J, Peltonen M, Abraham R, Al-Chalabi A, Bass NJ, Brayne C, Brown KS, Collinge J, Craig D, Deloukas P, Fox N, Gerrish A, Gill M, Gwilliam R, Harold D, Hollingworth P, Johnston JA, Jones L, Lawlor B, Livingston G, Lovestone S, Lupton M, Lynch A, Mann D, McGuinness B, McQuillin A, O'Donovan MC, Owen MJ, Passmore P, Powell JF, Proitsi P, Rossor M, Shaw CE, Smith AD, Gurling H, Todd S, Mummery C, Ryan N, Lapidogna G, Adames-Gómez A, Mauleón A, Pancho A, Gailhagenet A, Lafuente A, Macias-García D, Martín E, Pelejà E, Carrillo F, Merlín IS, Garrote-Espina L, Vargas L, Carrion-Claro M, Marín M, Labrador M, Buendia M, Alonso MD, Guitart M, Moreno M, Ibarria M, Perifán M, Aguilera N, Gómez-Garre P, Cañabate P, Escuela R, Pineda-Sánchez R, Vigo-Ortega R, Jesús S, Preckler S, Rodrigo-Herrero S, Diego S, Vacca A, Roveta F, Salvadori N, Chipi E, Boecker H, Laske C, Perneczky R, Anastasiou C, Janowitz D, Malik R, Anastasiou A, Parveen K, Lage C, López-García S, Antonell A, Mihova KY, Belezhanska D, Weber H, Kochen S, Solis P, Medel N, Lisso J, Sevillano Z, Politis DG, Cores V, Cuesta C, Ortiz C, Bacha JI, Rios M, Saenz A, Abalos MS, Kohler E, Palacio DL, Etchepareborda I, Kohler M, Novack G, Prestia FA, Galeano P, Castaño EM, Germani S, Toso CR, Rojo M, Ingino C, Mangone C, Rubinsztein DC, Teipel S, Fievet N, Deramerourt V, Forsell C, Thonberg H, Bjerke M, Roeck E De, Martínez-Larrad MT, Olivar N, Aguilera N, Cano A, Cañabate P, Macias J, Maroñas O, Nuñez-Llaves R, Olivé C, Pelejá E, Adames-Gómez AD, Alonso MD, Amer-Ferrer G, Antequera M, Burguera JA, Carrillo F, Carrión-Claro M, Casajeros MJ, Martinez de Pancorbo M, Escuela R, Garrote-Espina L, Gómez-Garre P, Hevilla S, Jesús S, Espinosa MAL, Legaz A, López-García S, Macias-García D, Manzanares S, Marín M, Marín-Muñoz J, Marín T, Martínez B, Martínez V, Martínez-Lage Álvarez P, Iriarte MM, Perifán-Tocino MT, Pineda-Sánchez R, Real de Asúa D, Rodrigo S, Sastre I, Vicente MP, Vigo-Ortega R, Vivancos L, Epelbaum J, Hannequin D, champion D, Deramecourt V, Tzourio C, Brice A, Dubois B, Williams A, Thomas C, Davies C, Nash W, Dowzell K, Morales AC, Bernardo-Harrington M, Turton J, Lord J, Brown K, Vardy E, Fisher E, Warren JD, Rossor M, Ryan NS, Guerreiro R, Uphill J, Bass N, Heun R, Kölsch H, Schürmann B, Lacour A, Herold C, Johnston

JA, Passmore P, Powell J, Patel Y, Hodges A, Becker T, Warden D, Wilcock G, Clarke R, Deloukas P, Ben-Shlomo Y, Hooper NM, Pickering-Brown S, Sussams R, Warner N, Bayer A, Heuser I, Drichel D, Klopp N, Mayhaus M, Riemenschneider M, Pinchler S, Feulner T, Gu W, van den Bussche H, Hüll M, Frölich L, Wichmann H-E, Jöckel K-H, O'Donovan M, Owen M, Bahrami S, Bosnes I, Selnes P, Bergh S, Palotie A, Daly M, Jacob H, Matakidou A, Runz H, John S, Plenge R, McCarthy M, Hunkapiller J, Ehm M, Waterworth D, Fox C, Malarstig A, Klinger K, Call K, Behrens T, Loerch P, Mäkelä T, Kaprio J, Virolainen P, Pulkki K, Kilpi T, Perola M, Partanen J, Pitkäranta A, Kaarteenoaho R, Vainio S, Turpeinen M, Serpi R, Laitinen T, Mäkelä J, Kosma V-M, Kujala U, Tuovila O, Hendolin M, Pakkanen R, Waring J, Riley-Gillis B, Liu J, Biswas S, Diogo D, Marshall C, Hu X, Gossel M, Graham R, Cummings B, Ripatti S, Schleutker J, Arvas M, Carpén O, Hinttala R, Kettunen J, Mannermaa A, Laukkanen J, Julkunen V, Remes A, Kälviäinen R, Peltola J, Tienari P, Rinne J, Ziemann A, Waring J, Esmaeili S, Smaoui N, Lehtonen A, Eaton S, Lahdenperä S, van Adelsberg J, Michon J, Kerchner G, Bowers N, Teng E, Eicher J, Mehta V, Gormley P, Linden K, Whelan C, Xu F, Pulford D, Färkkilä M, Pikkarainen S, Jussila A, Blomster T, Kiviniemi M, Voutilainen M, Georgantas B, Heap G, Rahimov F, Usiskin K, Lu T, Oh D, Kalpala K, Miller M, McCarthy L, Eklund K, Palomäki A, Isomäki P, Pirilä L, Kaipainen-Seppänen O, Huhtakangas J, Lertratanakul A, Hochfeld M, Bing N, Gordillo JE, Mars N, Pelkonen M, Kauppi P, Kankaanranta H, Harju T, Close D, Greenberg S, Chen H, Betts J, Ghosh S, Salomaa V, Niiranen T, Juonala M, Metsärinne K, Kähönen M, Juntila J, Laakso M, Pihlajamäki J, Sinisalo J, Taskinen M-R, Tuomi T, Challis B, Peterson A, Chu A, Parkkinen J, Muslin A, Joensuu H, Meretoja T, Aaltonen L, Mattson J, Auranen A, Karihtala P, Kauppila S, Auvinen P, Elenius K, Popovic R, Schutzman J, Loboda A, Chhibber A, Lehtonen H, McDonough S, Crohns M, Kulkarni D, Kaarniranta K, Turunen JA, Ollila T, Seitsonen S, Uusitalo H, Aaltonen V, Uusitalo-Järvinen H, Luodonpää M, Hautala N, Loomis S, Strauss E, Chen H, Podgornaia A, Hoffman J, Tasanen K, Huilaja L, Hannula-Jouppi K, Salmi T, Peltonen S, Koulu L, Harvima I, Wu Y, Choy D, Pussinen P, Salminen A, Salo T, Rice D, Nieminen P, Palotie U, Siponen M, Suominen L, Mäntylä P, Gursoy U, Anttonen V, Sipilä K, Davis JW, Quarless D, Petrovski S, Wigmore E, Chen C-Y, Bronson P, Tsai E, Huang Y, Maranville J, Shaikho E, Mohammed E, Wadhawan S, Kvikstad E, Caliskan M, Chang D, Bhangale T, Pendergrass S, Holzinger E, Chen X, Hedman Å, King KS, Wang C, Xu E, Auge F, Chatelain C, Rajpal D, Liu D, Call K, Xia T, Brauer M, Kurki M, Karjalainen J, Havulinna A, Jalanko A, Palta P, della Briotta Parolo P, Zhou W, Lemmelä S, Rivas M, Harju J, Lehisto A, Ganna A, Llorens V, Laivuori H, Rüeger S, Niemi ME, Tukiainen T, Reeve MP, Heyne H, Palin K, Garcia-Tabuenca J, Siirtola H, Kiiskinen T, Lee J, Tsuo K, Elliott A, Kristiansson K, Hyvärinen K, Ritari J, Koskinen M, Pylkäs K, Kalaoja M, Karjalainen M, Mantere T, Kangasniemi E, Heikkinen S, Laakkonen E, Sipeky C, Heron S, Karlsson A, Jambulingam D, Rathinakannan VS, Kajanne R, Aavikko M, Jiménez MG, della Briotta Parola P, Lehistö A, Kanai M, Kaunisto M, Kilpeläinen E, Sipilä TP, Brein G, Awaisa G, Shcherban A, Donner K, Loukola A, Laiho P, Sistonen T, Kaiharju E, Laukkanen M, Järvensivu E, Lähteenmäki S, Männikkö L, Wong R, Mattsson H, Hiekkalinna T, Paajanen T, Pärn K, Gracia-Tabuenca J, Abner E, Adams PM, Aguirre A, Albert MS, Albin RL, Allen M, Alvarez L, Apostolova LG, Arnold SE, Asthana S, Atwood CS, Ayres G, Baldwin CT, Barber RC, Barnes LL, Barral S, Beach TG, Becker JT, Beecham GW, Beekly D, Below JE, Benchek P, Benitez BA, Bennett D, Bertelson J, Margaret FE, Bird TD, Blacker D, Boeve BF, Bowen JD, Boxer A, Brewer J, Burke JR, Burns JM, Bush WS, Buxbaum JD, Cairns NJ, Cao C, Carlson CS, Carlsson CM, Carney RM, Carrasquillo MM, Chasse S, Chesselet M-F, Chesi A, Chin NA, Chui HC, Chung J, Craft S, Crane PK, Cribbs DH, Crocco EA, Cruchaga C, Cuccaro ML, Cullum M, Darby E, Davis B, De Jager PL, DeCarli C, DeToledo J, Dick M, Dickson DW, Dombroski BA, Doody RS, Duara R, Ertekin-Taner N, Evans DA, Fairchild TJ, Fallon KB, Farlow MR, Farrell JJ, Fernandez-Hernandez V, Ferris S, Frosch MP, Fulton-Howard B, Galasko DR, Gamboa A, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Grabowski TJ, Graff-Radford NR, Grant SFA, Green RC, Growdon JH, Haines JL, Hakonarson H, Hall J, Hamilton RL, Harari O, Harrell LE, Haut J, Head E, Henderson VW, Hernandez M, Hohman T, Honig LS, Huebinger RM, Huentelman MJ, Hulette CM, Hyman BT, Hynan LS, Ibanez L, Jarvik GP, Jayadev S, Jin L-W, Johnson K, Johnson L, Kamboh MI, Karydas AM, Katz MJ, Kaye JA, Keene CD, Khaleeq A, Kim R, Knebl J, Kowall NW, Kramer JH, Kuksa PP, LaFerla FM, Lah JJ, Larson EB, Lee C-Y, Lee EB, Lerner A, Leung YY, Leverenz JB, Levey AI, Li M, Lieberman AP, Lipton RB, Logue M,

- Lyketsos CG, Malamon J, Mains D, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, Massman P, Masurkar A, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McDonough S, McKee AC, Mesulam M, Mez J, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Montine TJ, Monuki ES, Morris JC, Myers AJ, Nguyen T, O'Bryant S, Olichney JM, Ory M, Palmer R, Parisi JE, Paulson HL, Pavlik V, Paydarfar D, Perez V, Peskind E, Petersen RC, Phillips-Cremins JE, Pierce A, Polk M, Poon WW, Potter H, Qu L, Quiceno M, Quinn JF, Raj A, Raskind M, Reiman EM, Reisberg B, Reisch JS, Ringman JM, Roberson ED, Rodriguear M, Rogaeva E, Rosen HJ, Rosenberg RN, Royall DR, Sager MA, Sano M, Saykin AJ, Schneider JA, Schneider LS, Seeley WW, Slifer SH, Small S, Smith AG, Smith JP, Song YE, Sonnen JA, Spina S, George-Hyslop PS, Stern RA, Stevens AB, Strittmatter SM, Sultzer D, Swerdlow RH, Tanzi RE, Tilson JL, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Tsuang DW, Valladares O, Van Deerlin VM, van Eldik LJ, Vassar R, Vinters H V., Vonsattel J-P, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Whitehead PL, Wijsman EM, Wilhelmsen KC, Williams B, Williamson J, Wilms H, Wingo TS, Wisniewski T, Woltjer RL, Woon M, Wright CB, Wu C-K, Younkin SG, Yu C-E, Yu L, Zhang Y, Zhao Y, Zhu X, Adams H, Akinyemi RO, Ali M, Armstrong N, Aparicio HJ, Bahadori M, Becker JT, Breteler M, Chasman D, Chauhan G, Comic H, Cox S, Cupples AL, Davies G, DeCarli CS, Duperron M-G, Dupuis J, Evans T, Fan F, Fitzpatrick A, Fohner AE, Ganguli M, Geerlings M, Glatt SJ, Gonzalez HM, Goss M, Grabe H, Habes M, Heckbert SR, Hofer E, Hong E, Hughes T, Kautz TF, Knol M, Kremen W, Lacaze P, Lahti J, Grand Q Le, Litkowski E, Li S, Liu D, Liu X, Loitfelder M, Manning A, Maillard P, Marioni R, Mazoyer B, van Lent DM, Mei H, Mishra A, Nyquist P, O'Connell J, Patel Y, Paus T, Pausova Z, Raikonen-Talvitie K, Riaz M, Rich S, Rotter J, Romero J, Roshchupkin G, Saba Y, Sargurupremraj M, Schmidt H, Schmidt R, Shulman JM, Smith J, Sekhar H, Rajula R, Shin J, Simino J, Sliz E, Teumer A, Thomas A, Tin A, Tucker-Drob E, Vojinovic D, Wang Y, Weinstein G, Williams D, Wittfeld K, Yanek L, Yang Y, Farrer LA, Psaty BM, Ghanbari M, Raj T, Sachdev P, Mather K, Jessen F, Ikram MA, de Mendonça A, Hort J, Tsolaki M, Pericak-Vance MA, Amouyel P, Williams J, Frikke-Schmidt R, Clarimon J, Deleuze J-F, Rossi G, Seshadri S, Andreassen OA, Ingelsson M, Hiltunen M, Sleegers K, Schellenberg GD, van Duijn CM, Sims R, van der Flier WM, Ruiz A, Ramirez A, Lambert J-C (2022) New insights into the genetic etiology of Alzheimer's disease and related dementias. *Nat Genet* 54:412–436. doi: 10.1038/s41588-022-01024-z
30. Benilova I, Karran E, De Strooper B (2012) The toxic A $\beta$  oligomer and Alzheimer's disease: an emperor in need of clothes. *Nat Neurosci* 15:349–357. doi: 10.1038/nn.3028
  31. Benzer S (1967) BEHAVIORAL MUTANTS OF *Drosophila* ISOLATED BY COUNTERCURRENT DISTRIBUTION. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 58:1112–1119. doi: 10.1073/pnas.58.3.1112
  32. Berke B, Wittnam J, McNeill E, Van Vactor DL, Keshishian H (2013) Retrograde BMP Signaling at the Synapse: A Permissive Signal for Synapse Maturation and Activity-Dependent Plasticity. *The Journal of Neuroscience* 33:17937–17950. doi: 10.1523/JNEUROSCI.6075-11.2013
  33. Bettens K, Brouwers N, Engelborghs S, Lambert J-C, Rogaeva E, Vandenberghe R, Le Bastard N, Pasquier F, Vermeulen S, Van Dongen J, Mattheijssens M, Peeters K, Mayeux R, St George-Hyslop P, Amouyel P, De Deyn PP, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2012) Both common variations and rare non-synonymous substitutions and small insertion/deletions in CLU are associated with increased Alzheimer risk. *Mol Neurodegener* 7:3. doi: 10.1186/1750-1326-7-3
  34. Bhatia VK, Madsen KL, Bolinger P-Y, Kunding A, Hedegård P, Gether U, Stamou D (2009) Amphipathic motifs in BAR domains are essential for membrane curvature sensing. *EMBO J* 28:3303–3314. doi: 10.1038/emboj.2009.261
  35. Bier E (2005) *Drosophila*, the golden bug, emerges as a tool for human genetics. *Nat Rev Genet* 6:9–23. doi: 10.1038/nrg1503
  36. Bitoun M, Maugendre S, Jeannet P-Y, Lacène E, Ferrer X, Laforêt P, Martin J-J, Laporte J, Lochmüller H, Beggs AH, Fardeau M, Eymard B, Romero NB, Guicheney P (2005) Mutations in dynamin 2 cause dominant centronuclear myopathy. *Nat Genet* 37:1207–1209. doi: 10.1038/ng1657
  37. Bloom GS (2014) Amyloid- $\beta$  and Tau. *JAMA Neurol* 71:505. doi: 10.1001/jamaneurol.2013.5847
  38. Böhm J, Vasli N, Maurer M, Cowling B, Shelton GD, Kress W, Toussaint A, Prokic I, Schara U, Anderson TJ, Weis J, Tiret L, Laporte J (2013) Altered Splicing of the BIN1 Muscle-Specific Exon in Humans and Dogs



- with Highly Progressive Centronuclear Myopathy. *PLoS Genet* 9:e1003430. doi: 10.1371/journal.pgen.1003430
39. Böhm J, Yiş U, Ortaç R, Çakmakçı H, Kurul SH, Dirik E, Laporte J (2010) Case report of intrafamilial variability in autosomal recessive centronuclear myopathy associated to a novel BIN1 stop mutation. *Orphanet J Rare Dis* 5:35. doi: 10.1186/1750-1172-5-35
  40. Bomasang-Layno E, Bronsther R (2021) Diagnosis and Treatment of Alzheimer's Disease:: An Update. *Dela J Public Health* 7:74–85. doi: 10.32481/djph.2021.09.009
  41. Bonini NM, Fortini ME (2003) Human neurodegenerative disease modeling using *Drosophila*. *Annu Rev Neurosci* 26:627–656. doi: 10.1146/annurev.neuro.26.041002.131425
  42. Boulanger A, Dura J-M (2015) Nuclear receptors and *Drosophila* neuronal remodeling. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849:187–195. doi: 10.1016/j.bbagr.2014.05.024
  43. Boulanger A, Farge M, Ramanoudjame C, Wharton K, Dura J-M (2012) *Drosophila* Motor Neuron Retraction during Metamorphosis Is Mediated by Inputs from TGF- $\beta$ /BMP Signaling and Orphan Nuclear Receptors. *PLoS One* 7:e40255. doi: 10.1371/journal.pone.0040255
  44. Braak H, Braak E (1991) Acta H' pathologica Neuropathological staging of Alzheimer-related changes
  45. Brabec V, Kasparkova J (2005) Modifications of DNA by platinum complexes. *Drug Resistance Updates* 8:131–146. doi: 10.1016/j.drug.2005.04.006
  46. Brettschneider J, Tredici K Del, Lee VM-Y, Trojanowski JQ (2015) Spreading of pathology in neurodegenerative diseases: a focus on human studies. *Nat Rev Neurosci* 16:109–120. doi: 10.1038/nrn3887
  47. Brion J-P, Passareiro H, Nunez J, Flament-Durand J (1985) Mise en évidence immunologique de la protéine Tau au niveau des lésions de dégénérescence neurofibrillaire de la maladie d'Alzheimer. *Arch Biol* 229–235
  48. Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N- *myc* in Untreated Human Neuroblastomas Correlates with Advanced Disease Stage. *Science* (1979) 224:1121–1124. doi: 10.1126/science.6719137
  49. Brouwers N, Van Cauwenberghe C, Engelborghs S, Lambert J-C, Bettens K, Le Bastard N, Pasquier F, Montoya AG, Peeters K, Mattheijssens M, Vandenberghe R, De Deyn PP, Cruts M, Amouyel P, Sleegers K, Van Broeckhoven C (2012) Alzheimer risk associated with a copy number variation in the complement receptor 1 increasing C3b/C4b binding sites. *Mol Psychiatry* 17:223–233. doi: 10.1038/mp.2011.24
  50. Bugarcic A, Zhe Y, Kerr MC, Griffin J, Collins BM, Teasdale RD (2011) Vps26A and Vps26B Subunits Define Distinct Retromer Complexes. *Traffic* 12:1759–1773. doi: 10.1111/j.1600-0854.2011.01284.x
  51. Buggia-Prévoit V, Fernandez CG, Riordan S, Vetrivel KS, Roseman J, Waters J, Bindokas VP, Vassar R, Thinakaran G (2014) Axonal BACE1 dynamics and targeting in hippocampal neurons: a role for Rab11 GTPase. *Mol Neurodegener* 9:1. doi: 10.1186/1750-1326-9-1
  52. Bushlin I, Petralia RS, Wu F, Harel A, Mughal MR, Mattson MP, Yao PJ (2008) Clathrin Assembly Protein AP180 and CALM Differentially Control Axogenesis and Dendrite Outgrowth in Embryonic Hippocampal Neurons. *The Journal of Neuroscience* 28:10257–10271. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2471-08.2008
  53. Busson D (1993) Peter A. Lawrence (1992); "The Making of a Fly: The Genetics of Animal Design", Blackwell Scientific Publications, Oxford, 229 pp. f16.95. ISBN: 0-632-30048-8. *J Evol Biol* 6:609–610. doi: 10.1046/j.1420-9101.1993.6040609.x
  54. Butler MH, David C, Ochoa GC, Freyberg Z, Daniell L, Grabs D, Cremona O, De Camilli P (1997) Amphiphysin II (SH3p9; BIN1), a member of the amphiphysin/Rvs family, is concentrated in the cortical cytomatrix of axon initial segments and nodes of ranvier in brain and around T tubules in skeletal muscle. *Journal of Cell Biology* 137:1355–1367. doi: 10.1083/jcb.137.6.1355
  55. C. Crdenas-Aguayo M del, C. Silva-Lucero M del, Cortes-Ortiz M, Jimnez-Ramos B, Gmez-Virgilio L, Ramrez-Rodrguez G, Vera- Arroyo E, Fiorentino-Prez R, Garca U, Luna-Muoz J, A. Meraz Ros M (2014)

- Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. In: *Neurochemistry. InTech*
56. Cacace R, Slegers K, Van Broeckhoven C (2016) Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's & Dementia* 12:733–748. doi: 10.1016/j.jalz.2016.01.012
  57. Cadigan KM, Peifer M (2009) Wnt Signaling from Development to Disease: Insights from Model Systems. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1:a002881–a002881. doi: 10.1101/cshperspect.a002881
  58. Caglayan S, Takagi-Niidome S, Liao F, Carlo A-S, Schmidt V, Burgert T, Kitago Y, Füchtbauer E-M, Füchtbauer A, Holtzman DM, Takagi J, Willnow TE (2014) Lysosomal Sorting of Amyloid- $\beta$  by the SORLA Receptor Is Impaired by a Familial Alzheimer's Disease Mutation. *Sci Transl Med* 6. doi: 10.1126/scitranslmed.3007747
  59. Cai Y, An SSA, Kim S (2015) Mutations in presenilin 2 and its implications in Alzheimer's disease and other dementia-associated disorders. *Clin Interv Aging* 10:1163–72. doi: 10.2147/CIA.S85808
  60. Calafate S, Flavin W, Verstreken P, Moechars D (2016) Loss of Bin1 Promotes the Propagation of Tau Pathology. *Cell Rep* 17:931–940. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.063
  61. Cascella R, Cecchi C (2021) Calcium Dyshomeostasis in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/ijms22094914
  62. Cassar M, Kretzschmar D (2016) Analysis of Amyloid Precursor Protein Function in *Drosophila melanogaster*. *Front Mol Neurosci* 9. doi: 10.3389/fnmol.2016.00061
  63. Cataldo a M, Barnett JL, Pieroni C, Nixon R a (1997) Increased neuronal endocytosis and protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis. *J Neurosci* 17:6142–51
  64. Cataldo AM, Petanceska S, Terio NB, Peterhoff CM, Durham R, Mercken M, Mehta PD, Buxbaum J, Haroutunian V, Nixon RA (2004) A $\beta$  localization in abnormal endosomes: association with earliest A $\beta$  elevations in AD and Down syndrome. *Neurobiol Aging* 25:1263–1272. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2004.02.027
  65. Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon R a. (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid  $\beta$  deposition in sporadic alzheimer's disease and down syndrome: Differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *American Journal of Pathology* 157:277–286. doi: 10.1016/S0002-9440(10)64538-5
  66. Chakrabarti R, Sanyal S, Ghosh A, Bhar K, Das C, Siddhanta A (2015) Phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase 1 $\alpha$  modulates ribosomal RNA gene silencing through its interaction with histone H3 lysine 9 trimethylation and heterochromatin protein HP1- $\alpha$ . *Journal of Biological Chemistry* 290:20893–20903. doi: 10.1074/jbc.M114.633727
  67. Chakraborty R, Vepuri V, Mhatre SD, Paddock BE, Miller S, Michelson SJ, Delvadia R, Desai A, Vinokur M, Melicharek DJ, Utreja S, Khandelwal P, Ansaloni S, Goldstein LE, Moir RD, Lee JC, Tabb LP, Saunders AJ, Marenda DR (2011) Characterization of a *Drosophila* Alzheimer's Disease Model: Pharmacological Rescue of Cognitive Defects. *PLoS One* 6:e20799. doi: 10.1371/journal.pone.0020799
  68. Chang MY, Boulden J, Katz JB, Wang L, Meyer TJ, Soler AP, Muller AJ, Prendergast GC (2007) Bin1 Ablation Increases Susceptibility to Cancer during Aging, Particularly Lung Cancer. *Cancer Res* 67:7605–7612. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-07-1100
  69. Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysert F, Pottiez V, Deloison G, Vandeputte A, Ayrat AM, Mendes T, Desai S, Goate AM, Kauwe JSK, Leroux F, Herledan A, Demiautte F, Bauer C, Checler F, Petersen RC, Blennow K, Zetterberg H, Minthon L, Van Deerlin VM, Lee VMY, Shaw LM, Trojanowski JQ, Albert M, Moghekar A, O'Brien R, Peskind ER, Malmanche N, Schellenberg GD, Dourlen P, Song OR, Cruchaga C, Amouyel P, Deprez B, Brodin P, Lambert JC (2017) Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol* 133:955–966. doi: 10.1007/s00401-016-1652-z
  70. Chapuis J, Hansmannel F, Gistelinc M, Mounier a., Van Cauwenberghe C, Kolen K V., Geller F, Sottejeau Y, Harold D, Dourlen P, Grenier-Boley B, Kamatani Y, Delepine B, Demiautte F, Zelenika D, Zommer N,

- Hamdane M, Bellenguez C, Dartigues JF, Hauw JJ, Letronne F, Ayral a. M, Sleegers K, Schellens a., Broeck L V., Engelborghs S, De Deyn PP, Vandenberghe R, O'Donovan M, Owen M, Epelbaum J, Mercken M, Karran E, Bantscheff M, Drewes G, Joberty G, Campion D, Octave JN, Berr C, Lathrop M, Callaerts P, Mann D, Williams J, Buée L, Dewachter I, Van Broeckhoven C, Amouyel P, Moechars D, Dermaut B, Lambert JC (2013) Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry* 18:1225–1234. doi: 10.1038/mp.2013.1
71. Chartier-Harlin M-C, Araria-Goumidi L, Lambert J-C (2002) Les formes tardives de la maladie d'Alzheimer : de la génétique à la biologie. *médecine/sciences* 18:709–716. doi: 10.1051/medsci/20021867709
  72. Chee F, Mudher A, Newman TA, Cuttle M, Lovestone S, Shepherd D (2006) Overexpression of tau results in defective synaptic transmission in *Drosophila* neuromuscular junctions. *Biochem Soc Trans* 34:88–90. doi: 10.1042/BST0340088
  73. Chia PZC, Toh WH, Sharples R, Gasnereau I, Hill AF, Gleeson PA (2013) Intracellular Itinerary of Internalised  $\beta$ -Secretase, BACE1, and Its Potential Impact on  $\beta$ -Amyloid Peptide Biogenesis. *Traffic* 14:997–1013. doi: 10.1111/tra.12088
  74. Choudhury SD, Dwivedi MK, Pippadpally S, Patnaik A, Mishra S, Padinjat R, Kumar V (2022) AP2 Regulates Thickveins Trafficking to Attenuate NMJ Growth Signaling in *Drosophila*. *eNeuro* 9:ENEURO.0044-22.2022. doi: 10.1523/ENEURO.0044-22.2022
  75. Christoforidis S, McBride HM, Burgoyne RD, Zerial M (1999) The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. *Nature* 397:621–625. doi: 10.1038/17618
  76. Cirrito JR, Kang J-E, Lee J, Stewart FR, Verges DK, Silverio LM, Bu G, Mennerick S, Holtzman DM (2008) Endocytosis Is Required for Synaptic Activity-Dependent Release of Amyloid- $\beta$  In Vivo. *Neuron* 58:42–51. doi: 10.1016/j.neuron.2008.02.003
  77. Claeys KG, Maisonobe T, Bohm J, Laporte J, Hezode M, Romero NB, Brochier G, Bitoun M, Carlier RY, Stojkovic T (2010) PHENOTYPE OF A PATIENT WITH RECESSIVE CENTRONUCLEAR MYOPATHY AND A NOVEL BIN1 MUTATION. *Neurology* 74:519–521. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181cef7f9
  78. Clarke GL (2012) Presynaptic active zone density during development and synaptic plasticity. *Front Mol Neurosci* 5. doi: 10.3389/fnmol.2012.00012
  79. Cline EN, Bicca MA, Viola KL, Klein WL (2018) The Amyloid- $\beta$  Oligomer Hypothesis: Beginning of the Third Decade. *Journal of Alzheimer's Disease* 64:S567–S610. doi: 10.3233/JAD-179941
  80. Collins CA, DiAntonio A (2007) Synaptic development: insights from *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 17:35–42. doi: 10.1016/j.conb.2007.01.001
  81. Colwill K, Field D, Moore L, Friesen J, Andrews B (1999) In Vivo Analysis of the Domains of Yeast Rvs167p Suggests Rvs167p Function Is Mediated Through Multiple Protein Interactions. *Genetics* 152:881–893. doi: 10.1093/genetics/152.3.881
  82. Consoulas C, Duch C, Bayline RJ, Levine RB (2000) Behavioral transformations during metamorphosis: remodeling of neural and motor systems. *Brain Res Bull* 53:571–583. doi: 10.1016/S0361-9230(00)00391-9
  83. Corces MR, Shcherbina A, Kundu S, Gloudemans MJ, Frésard L, Granja JM, Louie BH, Eulalio T, Shams S, Bagdatli ST, Mumbach MR, Liu B, Montine KS, Greenleaf WJ, Kundaje A, Montgomery SB, Chang HY, Montine TJ (2020) Single-cell epigenomic analyses implicate candidate causal variants at inherited risk loci for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Genet* 52:1158–1168. doi: 10.1038/s41588-020-00721-x
  84. Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, Roses AD, Haines JL, Pericak-Vance MA (1993) Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families. *Science* (1979) 261:921–923. doi: 10.1126/science.8346443
  85. Cormont M, Metón I, Mari M, Monzo P, Keslair F, Gaskin C, McGraw TE, Le Marchand-Brustel Y (2003) CD2AP/CMS Regulates Endosome Morphology and Traffic to the Degradative Pathway Through its Interaction with Rab4 and c-Cbl. *Traffic* 4:97–112. doi: 10.1034/j.1600-0854.2003.40205.x

86. Cosker KE, Segal RA (2014) Neuronal Signaling through Endocytosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a020669–a020669. doi: 10.1101/cshperspect.a020669
87. Cossec JC, Lavaur J, Berman DE, Rivals I, Hoischen A, Stora S, Ripoll C, Mircher C, Grattau Y, Olivomarin JC, De chaumont F, Lecourtois M, Antonarakis SE, Veltman J a., Delabar JM, Duyckaerts C, Di paolo G, Potier MC (2012) Trisomy for synaptojanin1 in down syndrome is functionally linked to the enlargement of early endosomes. *Hum Mol Genet* 21:3156–3172. doi: 10.1093/hmg/dds142
88. Cowling BS, Prokic I, Tasfaout H, Rabai A, Humbert F, Rinaldi B, Nicot A-S, Kretz C, Friant S, Roux A, Laporte J (2017) Amphiphysin (BIN1) negatively regulates dynamin 2 for normal muscle maturation. *Journal of Clinical Investigation* 127:4477–4487. doi: 10.1172/JCI90542
89. Creixell P, Jüri Reimand, Syed Haider, Guanming Wu, Tatsuhiko Shibata, Miguel Vazquez, Ville Mustonen, Abel Gonzalez-Perez, John Pearson, Chris Sander, Benjamin J Raphael, Debora S Marks, B F Francis Ouellette, Alfonso Valencia, Gary D Bader, Paul C Boutros, Joshua M Stuart, Rune Linding, Nuria Lopez-Bigas, Lincoln D Stein (2015) Pathway and network analysis of cancer genomes. *Nat Methods* 12:615–621. doi: 10.1038/nmeth.3440
90. Crotti A, Sait HR, McAvoy KM, Estrada K, Ergun A, Szak S, Marsh G, Jandreski L, Peterson M, Reynolds TL, Dalkilic-Liddle I, Cameron A, Cahir-McFarland E, Ransohoff RM (2019) BIN1 favors the spreading of Tau via extracellular vesicles. *Sci Rep* 9:1–20. doi: 10.1038/s41598-019-45676-0
91. Dahlgren KN, Manelli AM, Stine WB, Baker LK, Krafft GA, LaDu MJ (2002) Oligomeric and Fibrillar Species of Amyloid- $\beta$  Peptides Differentially Affect Neuronal Viability. *Journal of Biological Chemistry* 277:32046–32053. doi: 10.1074/jbc.M201750200
92. Dahmann (2016) *Drosophila*. Springer New York, New York, NY
93. Dammers C, Schwarten M, Buell AK, Willbold D (2017) Pyroglutamate-modified A $\beta$ (3-42) affects aggregation kinetics of A $\beta$ (1-42) by accelerating primary and secondary pathways. *Chem Sci* 8:4996–5004. doi: 10.1039/C6SC04797A
94. Das U, Scott DA, Ganguly A, Koo EH, Tang Y, Roy S (2013) Activity-Induced Convergence of APP and BACE-1 in Acidic Microdomains via an Endocytosis-Dependent Pathway. *Neuron* 79:447–460. doi: 10.1016/j.neuron.2013.05.035
95. David C, McPherson PS, Mundigl O, de Camilli P (1996) A role of amphiphysin in synaptic vesicle endocytosis suggested by its binding to dynamin in nerve terminals. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:331–335. doi: 10.1073/pnas.93.1.331
96. Dawkins E, Small DH (2014) Insights into the physiological function of the  $\beta$ -amyloid precursor protein: beyond Alzheimer's disease. *J Neurochem* 129:756–769. doi: 10.1111/jnc.12675
97. Deivasigamani S, Basargekar A, Shweta K, Sonavane P, Ratnaparkhi GS, Ratnaparkhi A (2015) A presynaptic regulatory system acts transsynaptically via Mon1 to regulate glutamate receptor levels in *Drosophila*. *Genetics* 201:651–664. doi: 10.1534/genetics.115.177402
98. Deshpande A, Mina E, Glabe C, Busciglio J (2006) Different Conformations of Amyloid  $\beta$  Induce Neurotoxicity by Distinct Mechanisms in Human Cortical Neurons. *The Journal of Neuroscience* 26:6011–6018. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1189-06.2006
99. Devkota S, Williams TD, Wolfe MS (2021) Familial Alzheimer's disease mutations in amyloid protein precursor alter proteolysis by  $\gamma$ -secretase to increase amyloid  $\beta$ -peptides of  $\geq 45$  residues. *J Biol Chem* 296:100281. doi: 10.1016/j.jbc.2021.100281
100. Dong J, Misselwitz R, Welfle H, Westermann P (2000) Expression and Purification of Dynamin II Domains and Initial Studies on Structure and Function. *Protein Expr Purif* 20:314–323. doi: 10.1006/prep.2000.1305
101. Dourlen P, Chapuis J, Lambert J-C (2018) Using High-Throughput Animal or Cell-Based Models to Functionally Characterize GWAS Signals. *Curr Genet Med Rep* 6:107–115. doi: 10.1007/s40142-018-0141-1
102. Dourlen P, Fernandez-Gomez FJ, Dupont C, Grenier-Boley B, Bellenguez C, Obriot H, Caillierez R, Sottejeau Y, Chapuis J, Bretteville a., Abdelfettah F, Delay C, Malmanche N, Soininen H, Hiltunen M, Galas MC,

- Amouyel P, Sergeant N, Buée L, Lambert JC, Dermaut B (2017) Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Mol Psychiatry* 22:874–883. doi: 10.1038/mp.2016.59
103. Dourlen P, Kilinc D, Malmanche N, Chapuis J, Lambert J-C (2019) The new genetic landscape of Alzheimer’s disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathol.* doi: 10.1007/s00401-019-02004-0
  104. Dourlen P, Levet C, Mejat A, Gambis A, Mollereau B (2013) The Tomato/GFP-FLP/FRT Method for Live Imaging of Mosaic Adult *Drosophila* Photoreceptor Cells. *Journal of Visualized Experiments* 1–9. doi: 10.3791/50610
  105. Dräger NM, Nachman E, Winterhoff M, Brühmann S, Shah P, Katsinelos T, Boulant S, Teleman A a, Faix J, Jahn TR (2017) Bin1 directly remodels actin dynamics through its BAR domain. *EMBO Rep* 18:2051–2066. doi: 10.15252/embr.201744137
  106. Dreyling MH, Martinez-Climent JA, Zheng M, Mao J, Rowley JD, Bohlander SK (1996) The t(10;11)(p13;q14) in the U937 cell line results in the fusion of the AF10 gene and CALM, encoding a new member of the AP-3 clathrin assembly protein family. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 93:4804–4809. doi: 10.1073/pnas.93.10.4804
  107. Drubin D, Kobayashi S, Kellogg D, Kirschner M (1988) Regulation of microtubule protein levels during cellular morphogenesis in nerve growth factor-treated PC12 cells. *Journal of Cell Biology* 106:1583–1591. doi: 10.1083/jcb.106.5.1583
  108. Dubois B, Villain N, Frisoni GB, Rabinovici GD, Sabbagh M, Cappa S, Bejanin A, Bombois S, Epelbaum S, Teichmann M, Habert M-O, Nordberg A, Blennow K, Galasko D, Stern Y, Rowe CC, Salloway S, Schneider LS, Cummings JL, Feldman HH (2021) Clinical diagnosis of Alzheimer’s disease: recommendations of the International Working Group. *Lancet Neurol* 20:484–496. doi: 10.1016/S1474-4422(21)00066-1
  109. Dubois L, Lecourtois M, Alexandre C, Hirst E, Vincent J-P (2001) Regulated Endocytic Routing Modulates Wingless Signaling in *Drosophila* Embryos. *Cell* 105:613–624. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00375-0
  110. Dunst S, Kazimiers T, von Zadow F, Jambor H, Sagner A, Brankatschk B, Mahmoud A, Spann S, Tomancak P, Eaton S, Brankatschk M (2015) Endogenously Tagged Rab Proteins: A Resource to Study Membrane Trafficking in *Drosophila*. *Dev Cell* 33:351–365. doi: 10.1016/j.devcel.2015.03.022
  111. Dunys J, Valverde A, Checler F (2018) Are N- and C-terminally truncated A $\beta$  species key pathological triggers in Alzheimer’s disease? *Journal of Biological Chemistry* 293:15419–15428. doi: 10.1074/jbc.R118.003999
  112. Dustin ML, Olszowy MW, Holdorf AD, Li J, Bromley S, Desai N, Widder P, Rosenberger F, van der Merwe PA, Allen PM, Shaw AS (1998) A Novel Adaptor Protein Orchestrates Receptor Patterning and Cytoskeletal Polarity in T-Cell Contacts. *Cell* 94:667–677. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81608-6
  113. van Dyck CH, Swanson CJ, Aisen P, Bateman RJ, Chen C, Gee M, Kanekiyo M, Li D, Reyderman L, Cohen S, Froelich L, Katayama S, Sabbagh M, Vellas B, Watson D, Dhadda S, Irizarry M, Kramer LD, Iwatsubo T (2023) Lecanemab in Early Alzheimer’s Disease. *New England Journal of Medicine* 388:9–21. doi: 10.1056/NEJMoa2212948
  114. Elliott K, Ge K, Du W, Prendergast GC (2000) The c-Myc-interacting adaptor protein Bin1 activates a caspase-independent cell death program. *Oncogene* 19:4669–4684. doi: 10.1038/sj.onc.1203681
  115. Ellis JD, Barrios-Rodiles M, Çolak R, Irimia M, Kim TH, Calarco J a., Wang X, Pan Q, O’Hanlon D, Kim PM, Wrana JL, Blencowe BJ (2012) Tissue-Specific Alternative Splicing Remodels Protein-Protein Interaction Networks. *Mol Cell* 46:884–892. doi: 10.1016/j.molcel.2012.05.037
  116. Eysert F (2019) Etude des mécanismes impliquant le facteur de risque génétique FERMT2 dans le métabolisme de l’APP et ses conséquences dans le processus physiopathologique de la maladie d’Alzheimer
  117. Farrer LA (1997) Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease. *JAMA* 278:1349. doi: 10.1001/jama.1997.03550160069041

118. Farsad K, Ringstad N, Takei K, Floyd SR, Rose K, De Camilli P (2001) Generation of high curvature membranes mediated by direct endophilin bilayer interactions. *Journal of Cell Biology* 155:193–200. doi: 10.1083/jcb.200107075
119. Fauquant C, Redeker V, Landrieu I, Wieruszeski J-M, Verdegem D, Lapr votte O, Lippens G, Gigant B, Knossow M (2011) Systematic Identification of Tubulin-interacting Fragments of the Microtubule-associated Protein Tau Leads to a Highly Efficient Promoter of Microtubule Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 286:33358–33368. doi: 10.1074/jbc.M111.223545
120. Feinberg MW, Wara AK, Cao Z, Lebedeva MA, Rosenbauer F, Iwasaki H, Hirai H, Katz JP, Haspel RL, Gray S, Akashi K, Segre J, Kaestner KH, Tenen DG, Jain MK (2007) The Kruppel-like factor KLF4 is a critical regulator of monocyte differentiation. *EMBO J* 26:4138–4148. doi: 10.1038/sj.emboj.7601824
121. Feng X, Teitelbaum SL, Quiroz ME, Cheng S-L, Lai C-F, Avioli L V., Ross FP (2000) Sp1/Sp3 and PU.1 Differentially Regulate  $\beta$ 5Integrin Gene Expression in Macrophages and Osteoblasts. *Journal of Biological Chemistry* 275:8331–8340. doi: 10.1074/jbc.275.12.8331
122. Fern ndez-Alfonso T, Ryan TA (2006) The efficiency of the synaptic vesicle cycle at central nervous system synapses. *Trends Cell Biol* 16:413–420. doi: 10.1016/j.tcb.2006.06.007
123. Fernando P, Sandoz JS, Ding W, de Repentigny Y, Brunette S, Kelly JF, Kothary R, Megeney LA (2009) Bin1 Src Homology 3 Domain Acts as a Scaffold for Myofiber Sarcomere Assembly. *Journal of Biological Chemistry* 284:27674–27686. doi: 10.1074/jbc.M109.029538
124. Ferreira A, Caceres A, Kosik K (1993) Intraneuronal compartments of the amyloid precursor protein. *The Journal of Neuroscience* 13:3112–3123. doi: 10.1523/JNEUROSCI.13-07-03112.1993
125. Ferreira IL, Bajouco LM, Mota SI, Auberson YP, Oliveira CR, Rego AC (2012) Amyloid beta peptide 1–42 disturbs intracellular calcium homeostasis through activation of GluN2B-containing N-methyl-d-aspartate receptors in cortical cultures. *Cell Calcium* 51:95–106. doi: 10.1016/j.ceca.2011.11.008
126. Ferretti MT, Iulita MF, Cavedo E, Chiesa PA, Schumacher Dimech A, Santuccione Chadha A, Baracchi F, Girouard H, Misoch S, Giacobini E, Depypere H, Hampel H (2018) Sex differences in Alzheimer disease — the gateway to precision medicine. *Nat Rev Neurol* 14:457–469. doi: 10.1038/s41582-018-0032-9
127. Di Fiore PP, De Camilli P (2001) Endocytosis and Signaling. *Cell* 106:1–4. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00428-7
128. Ford MCJ, Pearse BMF, Higgins MK, Vallis Y, Owen DJ, Gibson A, Hopkins CR, Evans PR, McMahon HT (2001) Simultaneous Binding of phospholipid. 291:3–7
129. Forner S, Baglietto-Vargas D, Martini AC, Trujillo-Estrada L, LaFerla FM (2017) Synaptic Impairment in Alzheimer’s Disease: A Dysregulated Symphony. *Trends Neurosci* 40:347–357. doi: 10.1016/j.tins.2017.04.002
130. FORREST D V. (2001) Time, Love, Memory: A Great Biologist and His Quest for the Origins of Behavior. *American Journal of Psychiatry* 158:828–828. doi: 10.1176/appi.ajp.158.5.828
131. Franzmeier N, Ossenkoppele R, Brendel M, Rubinski A, Smith R, Kumar A, Mattsson-Carlgr n N, Strandberg O, Duering M, Buerger K, Dichgans M, Hansson O, Ewers M (2021) The BIN1 rs744373 Alzheimer’s disease risk SNP is associated with faster A $\beta$ -associated tau accumulation and cognitive decline. *Alzheimer’s & Dementia* 18:103–115. doi: 10.1002/alz.12371
132. Franzmeier N, Ossenkoppele R, Brendel M, Rubinski A, Smith R, Kumar A, Mattsson-Carlgr n N, Strandberg O, Duering M, Buerger K, Dichgans M, Hansson O, Ewers M (2022) The *BIN1* rs744373 Alzheimer’s disease risk SNP is associated with faster A $\beta$ -associated tau accumulation and cognitive decline. *Alzheimer’s & Dementia* 18:103–115. doi: 10.1002/alz.12371
133. Franzmeier N, Rubinski A, Neitzel J, Ewers M, Weiner MW, Aisen P, Petersen R, Jack CR, Jagust W, Trojanowski JQ, Toga AW, Beckett L, Green RC, Saykin AJ, Morris J, Shaw LM, Khachaturian Z, Sorensen G, Kuller L, Raichle M, Paul S, Davies P, Fillit H, Hefti F, Holtzman D, Mesulam MM, Potter W, Snyder P, Schwartz A, Montine T, Thomas RG, Donohue M, Walter S, Gessert D, Sather T, Jimenez G, Harvey D, Bernstein M, Thompson P, Schuff N, Borowski B, Gunter J, Senjem M, Vemuri P, Jones D, Kantarci K, Ward C, Koeppe RA, Foster N, Reiman EM, Chen K, Mathis C, Landau S, Cairns NJ, Householder E, Taylor-

- Reinwald L, Lee V, Korecka M, Figurski M, Crawford K, Neu S, Foroud TM, Potkin SG, Shen L, Faber K, Kim S, Nho K, Thal L, Buckholtz N, Albert M, Frank R, Hsiao J, Kaye J, Quinn J, Lind B, Carter R, Dolen S, Schneider LS, Pawluczyk S, Beccera M, Teodoro L, Spann BM, Brewer J, Vanderswag H, Fleisher A, Heidebrink JL, Lord JL, Mason SS, Albers CS, Knopman D, Johnson K, Doody RS, Villanueva-Meyer J, Chowdhury M, Rountree S, Dang M, Stern Y, Honig LS, Bell KL, Ances B, Carroll M, Leon S, Mintun MA, Schneider S, Oliver A, Marson D, Griffith R, Clark D, Geldmacher D, Brockington J, Roberson E, Grossman H, Mitsis E, de Toledo-Morrell L, Shah RC, Duara R, Varon D, Greig MT, Roberts P, Onyike C, D'Agostino D, Kielb S, Galvin JE, Cerbone B, Michel CA, Rusinek H, de Leon MJ, Glodzik L, De Santi S, Doraiswamy PM, Petrella JR, Wong TZ, Arnold SE, Karlawish JH, Wolk D, Smith CD, Jicha G, Hardy P, Sinha P, Oates E, Conrad G, Lopez OL, Oakley M, Simpson DM, Porsteinsson AP, Goldstein BS, Martin K, Makino KM, Ismail MS, Brand C, Mulnard RA, Thai G, McAdams-Ortiz C, Womack K, Mathews D, Quiceno M, Diaz-Arrastia R, King R, Weiner M, Martin-Cook K, DeVous M, Levey AI, Lah JJ, Cellar JS, Burns JM, Anderson HS, Swerdlow RH, Apostolova L, Tingus K, Woo E, Silverman DHS, Lu PH, Bartzokis G, Graff-Radford NR, Parfitt F, Kendall T, Johnson H, Farlow MR, Hake AM, Matthews BR, Herring S, Hunt C, van Dyck CH, Carson RE, MacAvoy MG, Chertkow H, Bergman H, Hosein C, Hsiung G-YR, Feldman H, Mudge B, Assaly M, Bernick C, Munic D, Kertesz A, Rogers J, Trost D, Kerwin D, Lipowski K, Wu C-K, Johnson N, Sadowsky C, Martinez W, Villena T, Turner RS, Johnson K, Reynolds B, Sperling RA, Johnson KA, Marshall G, Frey M, Lane B, Rosen A, Tinklenberg J, Sabbagh MN, Belden CM, Jacobson SA, Sirrel SA, Kowall N, Killiany R, Budson AE, Norbash A, Johnson PL, Allard J, Lerner A, Ogrocki P, Hudson L, Fletcher E, Carmichael O, Olichney J, DeCarli C, Kittur S, Borrie M, Lee T-Y, Bartha R, Johnson S, Asthana S, Carlsson CM, Preda A, Nguyen D, Tariot P, Reeder S, Bates V, Capote H, Rainka M, Scharre DW, Kataki M, Adeli A, Zimmerman EA, Celmins D, Brown AD, Pearlson GD, Blank K, Anderson K, Santulli RB, Kitzmiller TJ, Schwartz ES, Sink KM, Williamson JD, Garg P, Watkins F, Ott BR, Querfurth H, Tremont G, Salloway S, Malloy P, Correia S, Rosen HJ, Miller BL, Mintzer J, Spicer K, Bachman D, Pasternak S, Rachinsky I, Drost D, Pomara N, Hernando R, Sarraeal A, Schultz SK, Boles Ponto LL, Shim H, Smith KE, Relkin N, Chaing G, Raudin L, Smith A, Fargher K, Raj BA, Neylan T, Grafman J, Davis M, Morrison R, Hayes J, Finley S, Friedl K, Fleischman D, Arfanakis K, James O, Massoglia D, Fruehling JJ, Harding S, Peskind ER, Petrie EC, Li G, Yesavage JA, Taylor JL, Furst AJ (2019) The BIN1 rs744373 SNP is associated with increased tau-PET levels and impaired memory. *Nat Commun* 10:1766. doi: 10.1038/s41467-019-09564-5
134. Frost A, Unger VM, De Camilli P (2009) The BAR Domain Superfamily: Membrane-Molding Macromolecules. *Cell* 137:191–196. doi: 10.1016/j.cell.2009.04.010
135. Fugier C, Klein AF, Hammer C, Vassilopoulos S, Ivarsson Y, Toussaint A, Tosch V, Vignaud A, Ferry A, Messaddeq N, Kokunai Y, Tsuburaya R, de la Grange P, Dembele D, Francois V, Precigout G, Boulade-Ladame C, Hummel M-C, de Munain AL, Sergeant N, Laquerrière A, Thibault C, Deryckere F, Auboeuf D, Garcia L, Zimmermann P, Udd B, Schoser B, Takahashi MP, Nishino I, Bassez G, Laporte J, Furling D, Charlet-Berguerand N (2011) Misregulated alternative splicing of BIN1 is associated with T tubule alterations and muscle weakness in myotonic dystrophy. *Nat Med* 17:720–725. doi: 10.1038/nm.2374
136. Furusawa K, Takasugi T, Chiu Y-W, Hori Y, Tomita T, Fukuda M, Hisanaga S (2019) CD2-associated protein (CD2AP) overexpression accelerates amyloid precursor protein (APP) transfer from early endosomes to the lysosomal degradation pathway. *Journal of Biological Chemistry* 294:10886–10899. doi: 10.1074/jbc.RA118.005385
137. Galderisi U, Di Bernardo G, Cipollaro M, Jori FP, Piegari E, Cascino A, Peluso G, Melone MAB (1999) Induction of apoptosis and differentiation in neuroblastoma and astrocytoma cells by the overexpression of Bin1, a novel myc interacting protein. *J Cell Biochem* 74:313–322. doi: 10.1002/(SICI)1097-4644(19990901)74:3<313::AID-JCB1>3.0.CO;2-Z
138. Gama Sosa MA, De Gasperi R, Elder GA (2012) Modeling human neurodegenerative diseases in transgenic systems. *Hum Genet* 131:535–563. doi: 10.1007/s00439-011-1119-1
139. Gamblin TC, Chen F, Zambrano A, Abraha A, Lagalwar S, Guillozet AL, Lu M, Fu Y, Garcia-Sierra F, LaPointe N, Miller R, Berry RW, Binder LI, Cryns VL (2003) Caspase cleavage of tau: Linking amyloid and

- neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100:10032–10037. doi: 10.1073/pnas.1630428100
140. Gao P, Ye L, Cheng H, Li H (2021) The Mechanistic Role of Bridging Integrator 1 (BIN1) in Alzheimer's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 41:1431–1440
  141. García-Campos MA, Espinal-Enríquez J, Hernández-Lemus E (2015) Pathway Analysis: State of the Art. *Front Physiol* 6. doi: 10.3389/fphys.2015.00383
  142. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S, Fiske A, Pedersen NL (2006) Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease. *Arch Gen Psychiatry* 63:168. doi: 10.1001/archpsyc.63.2.168
  143. Ge K, DuHadaway J, Du W, Herlyn M, Rodeck U, Prendergast GC (1999) Mechanism for elimination of a tumor suppressor: Aberrant splicing of a brain-specific exon causes loss of function of Bin1 in melanoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:9689–9694. doi: 10.1073/pnas.96.17.9689
  144. Ge K, DuHadaway J, Sakamuro D, Wechsler-Reya R, Reynolds C, Prendergast GC (2000) Losses of the tumor suppressor BIN1 in breast carcinoma are frequent and reflect deficits in programmed cell death capacity. *Int J Cancer* 85:376–83
  145. Ge K, Minhas F, DuHadaway J, Mao N-C, Wilson D, Buccafusca R, Sakamuro D, Nelson P, Malkowicz SB, Tomaszewski J, Prendergast GC (2000) Loss of heterozygosity and tumor suppressor activity of Bin1 in prostate carcinoma. *Int J Cancer* 86:155–161. doi: 10.1002/(SICI)1097-0215(20000415)86:2<155::AID-IJC2>3.0.CO;2-M
  146. Geng Z, Xu F-Y, Huang S-H, Chen Z-Y (2011) Sorting Protein-related Receptor SorLA Controls Regulated Secretion of Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor. *Journal of Biological Chemistry* 286:41871–41882. doi: 10.1074/jbc.M111.246413
  147. Genin E, Hannequin D, Wallon D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Bullido MJ, Engelborghs S, De Deyn P, Berr C, Pasquier F, Dubois B, Tognoni G, Fiévet N, Brouwers N, Bettens K, Arosio B, Coto E, Del Zompo M, Mateo I, Epelbaum J, Frank-Garcia A, Helisalmi S, Porcellini E, Pilotto A, Forti P, Ferri R, Scarpini E, Siciliano G, Solfrizzi V, Sorbi S, Spalletta G, Valdivieso F, Vepsäläinen S, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Hanon O, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Licastro F, Soininen H, Dartigues J-F, Kamboh MI, Van Broeckhoven C, Lambert JC, Amouyel P, Campion D (2011) APOE and Alzheimer disease: a major gene with semi-dominant inheritance. *Mol Psychiatry* 16:903–907. doi: 10.1038/mp.2011.52
  148. Gentier RJ, van Leeuwen FW (2015) Misframed ubiquitin and impaired protein quality control: an early event in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 8. doi: 10.3389/fnmol.2015.00047
  149. Ghaneie A, Zemba-Palca V, Itoh H, Itoh K, Sakamuro D, Nakamura S, Peralta Soler A, Prendergast GC (2007) Bin1 attenuation in breast cancer is correlated to nodal metastasis and reduced survival. *Cancer Biol Ther* 6:192–194. doi: 10.4161/cbt.6.2.3587
  150. Giannakopoulos P, Herrmann FR, Bussiere T, Bouras C, Kovari E, Perl DP, Morrison JH, Gold G, Hof PR (2003) Tangle and neuron numbers, but not amyloid load, predict cognitive status in Alzheimer's disease. *Neurology* 60:1495–1500. doi: 10.1212/01.WNL.0000063311.58879.01
  151. Gimber N, Tadeus G, Maritzen T, Schmoranzler J, Haucke V (2015) Diffusional spread and confinement of newly exocytosed synaptic vesicle proteins. *Nat Commun* 6:8392. doi: 10.1038/ncomms9392
  152. Giralt A, de Pins B, Cifuentes-Díaz C, López-Molina L, Farah AT, Tibile M, Deramecourt V, Arold ST, Ginés S, Hugon J, Girault JA (2018) PTK2B/Pyk2 overexpression improves a mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 307:62–73. doi: 10.1016/j.expneurol.2018.05.020
  153. Glennon EB, Lau DH-W, Gabriele RMC, Taylor MF, Troakes C, Elliott C, Killick R, Hanger DP, Perez-Nievas BG, Noble W (2019) Loss of the Alzheimer's-linked bridging integrator 1 (BIN1) protein affects synaptic structure and disrupts tau localisation and release
  154. Glennon EB, Lau DHW, Gabriele RMC, Taylor MF, Troakes C, Opie-Martin S, Elliott C, Killick R, Hanger DP, Perez-Nievas BG, Noble W (2020) Bridging integrator 1 protein loss in Alzheimer's disease promotes



- synaptic tau accumulation and disrupts tau release. *Brain Commun* 2:1–28. doi: 10.1093/braincomms/fcaa011
155. Glennon EBC, Whitehouse IJ, Miners JS, Kehoe PG, Love S, Kellett KAB, Hooper NM (2013) BIN1 Is Decreased in Sporadic but Not Familial Alzheimer’s Disease or in Aging. *PLoS One* 8:e78806. doi: 10.1371/journal.pone.0078806
  156. Glerup S, Lume M, Olsen D, Nyengaard JR, Vaegter CB, Gustafsen C, Christensen EI, Kjolby M, Hay-Schmidt A, Bender D, Madsen P, Saarma M, Nykjaer A, Petersen CM (2013) SorLA Controls Neurotrophic Activity by Sorting of GDNF and Its Receptors GFR $\alpha$ 1 and RET. *Cell Rep* 3:186–199. doi: 10.1016/j.celrep.2012.12.011
  157. Goedert M, Spillantini MG, Jakes R, Rutherford D, Crowther RA (1989) Multiple isoforms of human microtubule-associated protein tau: sequences and localization in neurofibrillary tangles of Alzheimer’s disease. *Neuron* 3:519–526. doi: 10.1016/0896-6273(89)90210-9
  158. Goedert M, Wischik CM, Crowther RA, Walker JE, Klug A (1988) Cloning and sequencing of the cDNA encoding a core protein of the paired helical filament of Alzheimer disease: identification as the microtubule-associated protein tau. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 85:4051–4055. doi: 10.1073/pnas.85.11.4051
  159. Gorczyca M, Budnik V (2006) Appendix: Anatomy of the Larval Body Wall Muscles and NMJs in the third instar larval stage. pp 367–373
  160. Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC, De Camilli P (1997) The SH3 Domain of Amphiphysin Binds the Proline-rich Domain of Dynamin at a Single Site That Defines a New SH3 Binding Consensus Sequence. *Journal of Biological Chemistry* 272:13419–13425. doi: 10.1074/jbc.272.20.13419
  161. Greenberg SG, Davies P (1990) A preparation of Alzheimer paired helical filaments that displays distinct tau proteins by polyacrylamide gel electrophoresis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:5827–5831. doi: 10.1073/pnas.87.15.5827
  162. Griciuc A, Federico AN, Natasan J, Forte AM, McGinty D, Nguyen H, Volak A, LeRoy S, Gandhi S, Lerner EP, Hudry E, Tanzi RE, Maguire CA (2020) Gene therapy for Alzheimer’s disease targeting CD33 reduces amyloid beta accumulation and neuroinflammation. *Hum Mol Genet* 29:2920–2935. doi: 10.1093/hmg/ddaa179
  163. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, George L, Tung YC, Kim KS, Wisniewski HM (1989) Amyloid protein and neurofibrillary tangles coexist in the same neuron in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 86:2853–2857. doi: 10.1073/pnas.86.8.2853
  164. Grundke-Iqbal I, Iqbal K, Quinlan M, Tung YC, Zaidi MS, Wisniewski HM (1986) Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem* 261:6084–9
  165. Guan B, Hartmann B, Kho Y-H, Gorczyca M, Budnik V (1996) The Drosophila tumor suppressor gene, *dlg*, is involved in structural plasticity at a glutamatergic synapse. *Current Biology* 6:695–706. doi: 10.1016/S0960-9822(09)00451-5
  166. Guimas Almeida C, Sadat Mirfakhar F, Perdigão C, Burrinha T (2018) Impact of late-onset Alzheimer’s genetic risk factors on beta-amyloid endocytic production. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75:2577–2589
  167. Gulisano W, Maugeri D, Baltrons MA, Fà M, Amato A, Palmeri A, D’Adamio L, Grassi C, Devanand DP, Honig LS, Puzzo D, Arancio O (2018) Role of Amyloid- $\beta$  and Tau Proteins in Alzheimer’s Disease: Confuting the Amyloid Cascade. *Journal of Alzheimer’s Disease* 64:S611–S631. doi: 10.3233/JAD-179935
  168. Gunn AP, Wong BX, Johanssen T, Griffith JC, Masters CL, Bush AI, Barnham KJ, Duce JA, Cherny RA (2016) Amyloid- $\beta$  Peptide A $\beta$ 3pE-42 Induces Lipid Peroxidation, Membrane Permeabilization, and Calcium Influx in Neurons. *Journal of Biological Chemistry* 291:6134–6145. doi: 10.1074/jbc.M115.655183
  169. Guo T, Noble W, Hanger DP (2017) Roles of tau protein in health and disease. *Acta Neuropathol* 133:665–704. doi: 10.1007/s00401-017-1707-9

170. Gylys KH, Fein JA, Yang F, Cole GM (2004) Enrichment of presynaptic and postsynaptic markers by size-based gating analysis of synaptosome preparations from rat and human cortex. *Cytometry* 60A:90–96. doi: 10.1002/cyto.a.20031
171. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and Proteolytic Processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270–a006270. doi: 10.1101/cshperspect.a006270
172. Hagel Joel, Douglas Allchin Douglas, Fred Singer (1997) Doing biology
173. Hampel H, Mesulam M-M, Cuello AC, Farlow MR, Giacobini E, Grossberg GT, Khachaturian AS, Vergallo A, Cavado E, Snyder PJ, Khachaturian ZS (2018) The cholinergic system in the pathophysiology and treatment of Alzheimer’s disease. *Brain* 141:1917–1933. doi: 10.1093/brain/awy132
174. Han Y, Ding K (2022) Imaging Neuropeptide Release at Drosophila Neuromuscular Junction with a Genetically Engineered Neuropeptide Release Reporter. pp 193–203
175. Hanes J, Zilka N, Bartkova M, Caletkova M, Dobrota D, Novak M (2009) Rat tau proteome consists of six tau isoforms: implication for animal models of human tauopathies. *J Neurochem* 108:1167–1176. doi: 10.1111/j.1471-4159.2009.05869.x
176. Hara M, Hirokawa K, Kamei S, Uchihara T (2013) Isoform transition from four-repeat to three-repeat tau underlies dendrosomatic and regional progression of neurofibrillary pathology. *Acta Neuropathol* 125:565–579. doi: 10.1007/s00401-013-1097-6
177. Hardy J, Selkoe DJ (2002) The Amyloid Hypothesis of Alzheimer’s Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science* (1979) 297:353–356. doi: 10.1126/science.1072994
178. Hardy JA, Higgins GA (1991) Hardy and Higgins., 1991. *Science* (1979) 256:184–185
179. Hardy JA, Higgins GA (1992) Alzheimer’s Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* (1979) 256:184–185. doi: 10.1126/science.1566067
180. Harel A, Mattson MP, Yao PJ (2011) CALM, A Clathrin Assembly Protein, Influences Cell Surface GluR2 Abundance. *Neuromolecular Med* 13:88–90. doi: 10.1007/s12017-010-8142-6
181. Harel A, Wu F, Mattson MP, Morris CM, Yao PJ (2008) Evidence for CALM in Directing VAMP2 Trafficking. *Traffic* 9:417–429. doi: 10.1111/j.1600-0854.2007.00694.x
182. Harold D, Abraham R, Hollingworth P, Sims R, Gerrish A, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Williams A, Jones N, Thomas C, Stretton A, Morgan AR, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Morgan K, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Love S, Kehoe PG, Hardy J, Mead S, Fox N, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Schürmann B, Heun R, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Hüll M, Rujescu D, Goate AM, Kauwe JSK, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel K-H, Klopp N, Wichmann H-E, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Holmans PA, O’Donovan M, Owen MJ, Williams J (2009) Genome-wide association study identifies variants at *CLU* and *PICALM* associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet* 41:1088–1093. doi: 10.1038/ng.440
183. Hartl D, Nebrich G, Klein O, Stephanowitz H, Krause E, Rohe M (2016) SORLA regulates calpain-dependent degradation of synapsin. *Alzheimer’s & Dementia* 12:952–963. doi: 10.1016/j.jalz.2016.02.008
184. Hazuka CD, Foletti DL, Hsu S-C, Kee Y, Hopf FW, Scheller RH (1999) The sec6/8 Complex Is Located at Neurite Outgrowth and Axonal Synapse-Assembly Domains. *The Journal of Neuroscience* 19:1324–1334. doi: 10.1523/JNEUROSCI.19-04-01324.1999
185. Hefti MM, Farrell K, Kim S, Bowles KR, Fowkes ME, Raj T, Crary JF (2018) High-resolution temporal and regional mapping of MAPT expression and splicing in human brain development. *PLoS One* 13:e0195771. doi: 10.1371/journal.pone.0195771
186. Hernandez P, Lee G, Sjoberg M, Maccioni RB (2009) Tau Phosphorylation by cdk5 and Fyn in Response to Amyloid Peptide A $\beta$ 25–35: Involvement of Lipid Rafts. *Journal of Alzheimer’s Disease* 16:149–156. doi: 10.3233/JAD-2009-0933

187. Herrup K (2015) The case for rejecting the amyloid cascade hypothesis. *Nat Neurosci* 18:794–799. doi: 10.1038/nn.4017
188. Hessvik NP, Llorente A (2018) Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cellular and Molecular Life Sciences* 75:193–208
189. Heutink P, Potier M-C, Claeysen RS, Pradier L (2018) Identification of the Modulators of and the Molecular Pathways Involved in the BIN1-Tau Interaction Tiago Mendes
190. Himmler A (1989) Structure of the bovine tau gene: alternatively spliced transcripts generate a protein family. *Mol Cell Biol* 9:1389–1396. doi: 10.1128/mcb.9.4.1389-1396.1989
191. Himmler A, Drechsel D, Kirschner MW, Martin DW (1989) Tau consists of a set of proteins with repeated C-terminal microtubule-binding domains and variable N-terminal domains. *Mol Cell Biol* 9:1381–1388. doi: 10.1128/mcb.9.4.1381-1388.1989
192. Hogarty MD, Liu X, Thompson PM, White PS, Sulman EP, Maris JM, Brodeur GM (2000) BIN1 inhibits colony formation and induces apoptosis in neuroblastoma cell lines with MYCN amplification. *Med Pediatr Oncol* 35:559–562. doi: 10.1002/1096-911X(20001201)35:6<559::AID-MPO14>3.0.CO;2-J
193. Højlund K, Bowen BP, Hwang H, Flynn CR, Madireddy L, Geetha T, Langlais P, Meyer C, Mandarino LJ, Yi Z (2009) In vivo Phosphoproteome of Human Skeletal Muscle Revealed by Phosphopeptide Enrichment and HPLC–ESI–MS/MS. *J Proteome Res* 8:4954–4965. doi: 10.1021/pr9007267
194. Holler CJ, Davis PR, Beckett TL, Platt TL, Webb RL, Head E, Murphy MP (2014) Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the alzheimer’s disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *Journal of Alzheimer’s Disease* 42:1221–1227. doi: 10.3233/JAD-132450
195. Hollingworth P, Harold D, Sims R, Gerrish A, Lambert J-C, Carrasquillo MM, Abraham R, Hamshere ML, Pahwa JS, Moskva V, Dowzell K, Jones N, Stretton A, Thomas C, Richards A, Ivanov D, Widdowson C, Chapman J, Lovestone S, Powell J, Proitsi P, Lupton MK, Brayne C, Rubinsztein DC, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Brown KS, Passmore PA, Craig D, McGuinness B, Todd S, Holmes C, Mann D, Smith AD, Beaumont H, Warden D, Wilcock G, Love S, Kehoe PG, Hooper NM, Vardy ERLC, Hardy J, Mead S, Fox NC, Rossor M, Collinge J, Maier W, Jessen F, Ruther E, Schürmann B, Heun R, Kölsch H, van den Bussche H, Heuser I, Kornhuber J, Wiltfang J, Dichgans M, Frölich L, Hampel H, Gallacher J, Hüll M, Rujescu D, Giegling I, Goate AM, Kauwe JSK, Cruchaga C, Nowotny P, Morris JC, Mayo K, Sleegers K, Bettens K, Engelborghs S, De Deyn PP, Van Broeckhoven C, Livingston G, Bass NJ, Gurling H, McQuillin A, Gwilliam R, Deloukas P, Al-Chalabi A, Shaw CE, Tsolaki M, Singleton AB, Guerreiro R, Mühleisen TW, Nöthen MM, Moebus S, Jöckel K-H, Klopp N, Wichmann H-E, Pankratz VS, Sando SB, Aasly JO, Barcikowska M, Wszolek ZK, Dickson DW, Graff-Radford NR, Petersen RC, van Duijn CM, Breteler MMB, Ikram MA, DeStefano AL, Fitzpatrick AL, Lopez O, Launer LJ, Seshadri S, Berr C, Campion D, Epelbaum J, Dartigues J-F, Tzourio C, Alperovitch A, Lathrop M, Feulner TM, Friedrich P, Riehle C, Krawczak M, Schreiber S, Mayhaus M, Nicolhaus S, Wagenpfeil S, Steinberg S, Stefansson H, Stefansson K, Snædal J, Björnsson S, Jonsson P V, Chouraki V, Genier-Boley B, Hiltunen M, Soininen H, Combarros O, Zelenika D, Delepine M, Bullido MJ, Pasquier F, Mateo I, Frank-Garcia A, Porcellini E, Hanon O, Coto E, Alvarez V, Bosco P, Siciliano G, Mancuso M, Panza F, Solfrizzi V, Nacmias B, Sorbi S, Bossù P, Piccardi P, Arosio B, Annoni G, Seripa D, Pilotto A, Scarpini E, Galimberti D, Brice A, Hannequin D, Licastro F, Jones L, Holmans PA, Jonsson T, Riemenschneider M, Morgan K, Younkin SG, Owen MJ, O’Donovan M, Amouyel P, Williams J (2011) Common variants at ABCA7, MS4A6A/MS4A4E, EPHA1, CD33 and CD2AP are associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet* 43:429–435. doi: 10.1038/ng.803
196. Holstege H, Hulsman M, Charbonnier C, Grenier-Boley B, Quenez O, Grozeva D, van Rooij JGJ, Sims R, Ahmad S, Amin N, Norsworthy PJ, Dols-Icardo O, Hummerich H, Kawalia A, Amouyel P, Beecham GW, Berr C, Bis JC, Boland A, Bossù P, Bouwman F, Bras J, Campion D, Cochran JN, Daniele A, Dartigues J-F, Debette S, Deleuze J-F, Denning N, DeStefano AL, Farrer LA, Fernández MV, Fox NC, Galimberti D, Genin E, Gille JJP, Le Guen Y, Guerreiro R, Haines JL, Holmes C, Ikram MA, Ikram MK, Jansen IE, Kraaij R, Lathrop M, Lemstra AW, Lleó A, Luckcuck L, Mannens MMAM, Marshall R, Martin ER, Masullo C, Mayeux R, Mecocci P, Meggy A, Mol MO, Morgan K, Myers RM, Nacmias B, Naj AC, Napolioni V, Pasquier F, Pastor

- P, Pericak-Vance MA, Raybould R, Redon R, Reinders MJT, Richard A-C, Riedel-Heller SG, Rivadeneira F, Rousseau S, Ryan NS, Saad S, Sanchez-Juan P, Schellenberg GD, Scheltens P, Schott JM, Seripa D, Seshadri S, Sie D, Sistermans EA, Sorbi S, van Spaendonk R, Spalletta G, Tesi N, Tijms B, Uitterlinden AG, van der Lee SJ, Visser PJ, Wagner M, Wallon D, Wang L-S, Zarea A, Clarimon J, van Swieten JC, Greicius MD, Yokoyama JS, Cruchaga C, Hardy J, Ramirez A, Mead S, van der Flier WM, van Duijn CM, Williams J, Nicolas G, Bellenguez C, Lambert J-C (2022) Exome sequencing identifies rare damaging variants in ATP8B4 and ABCA1 as risk factors for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 54:1786–1794. doi: 10.1038/s41588-022-01208-7
197. Hong M (1998) Mutation-Specific Functional Impairments in Distinct Tau Isoforms of Hereditary FTDP-17. *Science* (1979) 282:1914–1917. doi: 10.1126/science.282.5395.1914
  198. Hong T-T, Cogswell R, James CA, Kang G, Pullinger CR, Malloy MJ, Kane JP, Wojciak J, Calkins H, Scheinman MM, Tseng ZH, Ganz P, De Marco T, Judge DP, Shaw RM (2012) Plasma BIN1 correlates with heart failure and predicts arrhythmia in patients with arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy. *Heart Rhythm* 9:961–967. doi: 10.1016/j.hrthm.2012.01.024
  199. Hong T-T, Smyth JW, Chu KY, Vogan JM, Fong TS, Jensen BC, Fang K, Halushka MK, Russell SD, Colecraft H, Hoopes CW, Ocorr K, Chi NC, Shaw RM (2012) BIN1 is reduced and Cav1.2 trafficking is impaired in human failing cardiomyocytes. *Heart Rhythm* 9:812–820. doi: 10.1016/j.hrthm.2011.11.055
  200. Hong T-T, Smyth JW, Gao D, Chu KY, Vogan JM, Fong TS, Jensen BC, Colecraft HM, Shaw RM (2010) BIN1 Localizes the L-Type Calcium Channel to Cardiac T-Tubules. *PLoS Biol* 8:e1000312. doi: 10.1371/journal.pbio.1000312
  201. Hsu VW, Prekeris R (2010) Transport at the recycling endosome. *Curr Opin Cell Biol* 22:528–534. doi: 10.1016/j.ceb.2010.05.008
  202. Hu X, Pickering E, Liu YC, Hall S, Fournier H, Katz E, Dechairo B, John S, Van Eerdewegh P, Soares H (2011) Meta-Analysis for Genome-Wide Association Study Identifies Multiple Variants at the BIN1 Locus Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease. *PLoS One* 6:e16616. doi: 10.1371/journal.pone.0016616
  203. Hu Y-B, Dammer EB, Ren R-J, Wang G (2015) The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4:18. doi: 10.1186/s40035-015-0041-1
  204. Hu Y-S, Xin J, Hu Y, Zhang L, Wang J (2017) Analyzing the genes related to Alzheimer's disease via a network and pathway-based approach. *Alzheimers Res Ther* 9:29. doi: 10.1186/s13195-017-0252-z
  205. Huang Y-WA, Zhou B, Wernig M, Südhof TC (2017) ApoE2, ApoE3, and ApoE4 Differentially Stimulate APP Transcription and A $\beta$  Secretion. *Cell* 168:427–441.e21. doi: 10.1016/j.cell.2016.12.044
  206. Hung C, Tuck E, Stubbs V, van der Lee SJ, Aalfs C, van Spaendonk R, Scheltens P, Hardy J, Holstege H, Livesey FJ (2021) SORL1 deficiency in human excitatory neurons causes APP-dependent defects in the endolysosome-autophagy network. *Cell Rep* 35:109259. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109259
  207. Husain MA, Laurent B, Plourde M (2021) APOE and Alzheimer's Disease: From Lipid Transport to Physiopathology and Therapeutics. *Front Neurosci* 15. doi: 10.3389/fnins.2021.630502
  208. Huser S, Suri G, Crottet P, Spiess M (2013) Interaction of amphiphysins with AP-1 clathrin adaptors at the membrane. *Biochemical Journal* 450:73–83. doi: 10.1042/bj20121373
  209. Iaccarino L, Tammewar G, Ayakta N, Baker SL, Bejanin A, Boxer AL, Gorno-Tempini ML, Janabi M, Kramer JH, Lazaris A, Lockhart SN, Miller BL, Miller ZA, O'Neil JP, Ossenkoppele R, Rosen HJ, Schonhaut DR, Jagust WJ, Rabinovici GD (2018) Local and distant relationships between amyloid, tau and neurodegeneration in Alzheimer's Disease. *Neuroimage Clin* 17:452–464. doi: 10.1016/j.nicl.2017.09.016
  210. Iqbal K, Liu F, Gong C-X (2016) Tau and neurodegenerative disease: the story so far. *Nat Rev Neurol* 12:15–27. doi: 10.1038/nrneurol.2015.225
  211. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C, Hefferan MP, Van Gorp S, Nazor KL, Boscolo FS, Carson CT, Laurent LC, Marsala M, Gage FH, Remes AM, Koo EH, Goldstein LSB (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482:216–220. doi: 10.1038/nature10821

212. Ittner LM, Ke YD, Delerue F, Bi M, Gladbach A, van Eersel J, Wölfing H, Chieng BC, Christie MJ, Napier IA, Eckert A, Staufenbiel M, Hardeman E, Götz J (2010) Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- $\beta$  Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models. *Cell* 142:387–397. doi: 10.1016/j.cell.2010.06.036
213. Jack CR, Knopman DS, Jagust WJ, Petersen RC, Weiner MW, Aisen PS, Shaw LM, Vemuri P, Wiste HJ, Weigand SD, Lesnick TG, Pankratz VS, Donohue MC, Trojanowski JQ (2013) Tracking pathophysiological processes in Alzheimer's disease: an updated hypothetical model of dynamic biomarkers. *Lancet Neurol* 12:207–216. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70291-0
214. Jackson GR, Salecker I, Dong X, Yao X, Arnheim N, Faber PW, MacDonald ME, Zipursky SL (1998) Polyglutamine-Expanded Human Huntingtin Transgenes Induce Degeneration of *Drosophila* Photoreceptor Neurons. *Neuron* 21:633–642. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80573-5
215. Jaiswal M, Sandoval H, Zhang K, Bayat V, Bellen HJ (2012) Probing Mechanisms That Underlie Human Neurodegenerative Diseases in *Drosophila*. *Annu Rev Genet* 46:371–396. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155456
216. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, Sealock J, Karlsson IK, Hägg S, Athanasiu L, Voyle N, Proitsi P, Witoelar A, Stringer S, Aarsland D, Almdahl IS, Andersen F, Bergh S, Bettella F, Bjornsson S, Brækhus A, Bråthen G, de Leeuw C, Desikan RS, Djurovic S, Dumitrescu L, Fladby T, Hohman TJ, Jonsson P V., Kiddle SJ, Rongve A, Saltvedt I, Sando SB, Selbæk G, Shoai M, Skene NG, Snaedal J, Stordal E, Ulstein ID, Wang Y, White LR, Hardy J, Hjerling-Leffler J, Sullivan PF, van der Flier WM, Dobson R, Davis LK, Stefansson H, Stefansson K, Pedersen NL, Ripke S, Andreassen OA, Posthuma D (2019) Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet* 51:404–413. doi: 10.1038/s41588-018-0311-9
217. Jarrett JT, Lansbury PT (1993) Seeding "one-dimensional crystallization" of amyloid: A pathogenic mechanism in Alzheimer's disease and scrapie? *Cell* 73:1055–1058. doi: 10.1016/0092-8674(93)90635-4
218. Jiang Y, Rigoglioso A, Peterhoff CM, Pawlik M, Sato Y, Bleiwas C, Stavrides P, Smiley JF, Ginsberg SD, Mathews PM, Levy E, Nixon RA (2016) Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration: Role of APP-CTF. *Neurobiol Aging* 39:90–98. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.013
219. Jonsson T, Stefansson H, Steinberg S, Jonsdottir I, Jonsson P V., Snaedal J, Bjornsson S, Huttenlocher J, Levey AI, Lah JJ, Rujescu D, Hampel H, Giegling I, Andreassen OA, Engedal K, Ulstein I, Djurovic S, Ibrahim-Verbaas C, Hofman A, Ikram MA, van Duijn CM, Thorsteinsdottir U, Kong A, Stefansson K (2013) Variant of TREM2 Associated with the Risk of Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 368:107–116. doi: 10.1056/NEJMoa1211103
220. Jucker M, Walker LC (2011) Pathogenic protein seeding in alzheimer disease and other neurodegenerative disorders. *Ann Neurol* 70:532–540. doi: 10.1002/ana.22615
221. Jucker M, Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501:45–51. doi: 10.1038/nature12481
222. Jucker M, Walker LC (2013) Self-propagation of pathogenic protein aggregates in neurodegenerative diseases. *Nature* 501:45–51. doi: 10.1038/nature12481
223. Kajihō H, Saito K, Tsujita K, Kontani K, Araki Y, Kurosu H, Katada T (2003) RIN3: A novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* 116:4159–4168. doi: 10.1242/jcs.00718
224. Kamalesh K, Trivedi D, Toscano S, Sharma S, Kolay S, Raghu P (2017) Phosphatidylinositol 5-phosphate 4-kinase regulates early endosomal dynamics during clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Sci* 130:2119–2133. doi: 10.1242/jcs.202259
225. Kamboh MI, Demirci FY, Wang X, Minster RL, Carrasquillo MM, Pankratz VS, Younkin SG, Saykin AJ, Jun G, Baldwin C, Logue MW, Buros J, Farrer L, Pericak-Vance MA, Haines JL, Sweet RA, Ganguli M, Feingold E, DeKosky ST, Lopez OL, Barmada MM (2012) Genome-wide association study of Alzheimer's disease. *Transl Psychiatry* 2:e117–e117. doi: 10.1038/tp.2012.45
226. Kanamori T, Togashi K, Koizumi H, Emoto K (2015) Dendritic Remodeling. pp 1–25

227. Kanatsu K, Morohashi Y, Suzuki M, Kuroda H, Watanabe T, Tomita T, Iwatsubo T (2014) Decreased CALM expression reduces A $\beta$ 42 to total A $\beta$  ratio through clathrin-mediated endocytosis of  $\gamma$ -secretase. *Nat Commun* 5:3386. doi: 10.1038/ncomms4386
228. Kandimalla R, Reddy PH (2016) Multiple faces of dynamin-related protein 1 and its role in Alzheimer's disease pathogenesis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1862:814–828. doi: 10.1016/j.bbadis.2015.12.018
229. Kashyap G, Bapat D, Das D, Gowaiakar R, Amritkar RE, Rangarajan G, Ravindranath V, Ambika G (2019) Synapse loss and progress of Alzheimer's disease -A network model. *Sci Rep* 9:6555. doi: 10.1038/s41598-019-43076-y
230. Katzmann DJ, Babst M, Emr SD (2001) Ubiquitin-Dependent Sorting into the Multivesicular Body Pathway Requires the Function of a Conserved Endosomal Protein Sorting Complex, ESCRT-I. *Cell* 106:145–155. doi: 10.1016/S0092-8674(01)00434-2
231. Kaur G, Lakkaraju A (2018) Early Endosome Morphology in Health and Disease. pp 335–343
232. Kauwe JSK, Cruchaga C, Karch CM, Sadler B, Lee M, Mayo K, Latu W, Su'a M, Fagan AM, Holtzman DM, Morris JC, Goate AM (2011) Fine Mapping of Genetic Variants in BIN1, CLU, CR1 and PICALM for Association with Cerebrospinal Fluid Biomarkers for Alzheimer's Disease. *PLoS One* 6:e15918. doi: 10.1371/journal.pone.0015918
233. Keller EF (1996) *Drosophila* Embryos as Transitional Objects: The Work of Donald Poulson and Christiane Nüsslein-Volhard. *Historical Studies in the Physical and Biological Sciences* 26:313–346. doi: 10.2307/27757764
234. Kelly SM, Elchert A, Kahl M (2017) Dissection and Immunofluorescent Staining of Mushroom Body and Photoreceptor Neurons in Adult *Drosophila melanogaster*; Brains. *Journal of Visualized Experiments*. doi: 10.3791/56174
235. Kempf M, Clement A, Faissner A, Lee G, Brandt R (1996) Tau Binds to the Distal Axon Early in Development of Polarity in a Microtubule- and Microfilament-Dependent Manner. *The Journal of Neuroscience* 16:5583–5592. doi: 10.1523/JNEUROSCI.16-18-05583.1996
236. Kennah E, Ringrose A, Zhou LL, Esmailzadeh S, Qian H, Su M, Zhou Y, Jiang X (2009) Identification of tyrosine kinase, HCK, and tumor suppressor, BIN1, as potential mediators of AHI-1 oncogene in primary and transformed CTCL cells. *Blood* 113:4646–4655. doi: 10.1182/blood-2008-08-174037
237. Kessels MM, Qualmann B (2004) The syndapin protein family: Linking membrane trafficking with the cytoskeleton. *J Cell Sci* 117:3077–3086. doi: 10.1242/jcs.01290
238. Kessissoglou IA, Langui D, Hasan A, Maral M, Dutta SB, Hiesinger PR, Hassan BA (2020) The *Drosophila* amyloid precursor protein homologue mediates neuronal survival and neuroglial interactions. *PLoS Biol* 18:1–24. doi: 10.1371/journal.pbio.3000703
239. Kim J, Basak JM, Holtzman DM (2009) The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease. *Neuron* 63:287–303. doi: 10.1016/j.neuron.2009.06.026
240. Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A, Rigoglioso A, Jiang Y, Nixon RA (2016) Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- $\beta$ CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 21:707–716. doi: 10.1038/mp.2015.97
241. Kim WS, Li H, Ruberu K, Chan S, Elliott DA, Low JK, Cheng D, Karl T, Garner B (2013) Deletion of *Abca7* Increases Cerebral Amyloid- $\beta$  Accumulation in the J20 Mouse Model of Alzheimer's Disease. *The Journal of Neuroscience* 33:4387–4394. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4165-12.2013
242. Kim Y-M, Park S, Choi SY, Oh SB, Jung M, Pack C-G, Hwang JJ, Tak E, Lee J-Y (2022) Clusterin Binding Modulates the Aggregation and Neurotoxicity of Amyloid- $\beta$ (1–42). *Mol Neurobiol* 59:6228–6244. doi: 10.1007/s12035-022-02973-6
243. King-Robson J, Wilson H, Politis M, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative (2021) Associations Between Amyloid and Tau Pathology, and Connectome Alterations, in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment. *J Alzheimers Dis* 82:541–560. doi: 10.3233/JAD-201457

244. Kittel RJ, Heckmann M (2016) Synaptic Vesicle Proteins and Active Zone Plasticity. *Front Synaptic Neurosci* 8. doi: 10.3389/fnsyn.2016.00008
245. Knupp A, Mishra S, Martinez R, Braggin JE, Szabo M, Kinoshita C, Hailey DW, Small SA, Jayadev S, Young JE (2020) Depletion of the AD Risk Gene SORL1 Selectively Impairs Neuronal Endosomal Traffic Independent of Amyloidogenic APP Processing. *Cell Rep* 31:107719. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107719
246. Koch D, Spiwoks-Becker I, Sabanov V, Sinning A, Dugladze T, Stellmacher A, Ahuja R, Grimm J, Schüler S, Müller A, Angenstein F, Ahmed T, Diesler A, Moser M, Tom Dieck S, Spessert R, Boeckers TM, Fässler R, Hübner CA, Balschun D, Gloveli T, Kessels MM, Qualmann B (2011) Proper synaptic vesicle formation and neuronal network activity critically rely on syndapin I. *EMBO Journal* 30:4955–4969. doi: 10.1038/emboj.2011.339
247. Koh YH, Gramates LS, Budnik V (2000) *Drosophila* larval neuromuscular junction: Molecular components and mechanisms underlying synaptic plasticity. *Microsc Res Tech* 49:14–25. doi: 10.1002/(SICI)1097-0029(20000401)49:1<14::AID-JEMT3>3.0.CO;2-G
248. Kohler Robert E. (1994) Lords of the fly. *Drosophila genetics and the experimental life*.
249. Kojima C, Hashimoto A, Yabuta I, Hirose M, Hashimoto S, Kanaho Y, Sumimoto H, Ikegami T, Sabe H (2004) Regulation of Bin1 SH3 domain binding by phosphoinositides. *EMBO Journal* 23:4413–4422. doi: 10.1038/sj.emboj.7600442
250. Koles K, Messelaar EM, Feiger Z, Yu CJ, Frank CA, Rodal AA (2015) The EHD protein Past1 controls postsynaptic membrane elaboration and synaptic function. *Mol Biol Cell* 26:3275–3288. doi: 10.1091/mbc.E15-02-0093
251. Kondo J, Honda T, Mori H, Hamada Y, Miura R, Ogawara M, Ihara Y (1988) The carboxyl third of tau is tightly bound to paired helical filaments. *Neuron* 1:827–834. doi: 10.1016/0896-6273(88)90130-4
252. Koo SJ, Kochlamazashvili G, Rost B, Puchkov D, Gimber N, Lehmann M, Tadeus G, Schmoranzer J, Rosenmund C, Haucke V, Maritzen T (2015) Vesicular Synaptobrevin/VAMP2 Levels Guarded by AP180 Control Efficient Neurotransmission. *Neuron* 88:330–344. doi: 10.1016/j.neuron.2015.08.034
253. Koo SJ, Markovic S, Puchkov D, Mahrenholz CC, Beceren-Braun F, Maritzen T, Dervede J, Volkmer R, Oschkinat H, Haucke V (2011) SNARE motif-mediated sorting of synaptobrevin by the endocytic adaptors clathrin assembly lymphoid myeloid leukemia (CALM) and AP180 at synapses. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108:13540–13545. doi: 10.1073/pnas.1107067108
254. Koo SJ, Puchkov D, Haucke V (2011) AP180 and CALM. *Cell Logist* 1:168–172. doi: 10.4161/cl.1.4.18897
255. Kucukkilic E, Brookes K, Barber I, Guetta-Baranes T, ARUK Consortium, Morgan K, Hollox EJ (2018) Complement receptor 1 gene (CR1) intragenic duplication and risk of Alzheimer's disease. *Hum Genet* 137:305–314. doi: 10.1007/s00439-018-1883-2
256. Kumar V, Alla SR, Krishnan KS, Ramaswami M (2009) Syndapin is dispensable for synaptic vesicle endocytosis at the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Molecular and Cellular Neuroscience* 40:234–241. doi: 10.1016/j.mcn.2008.10.011
257. Kumfor F, Halliday GM, Piguet O (2017) Clinical Aspects of Alzheimer's Disease. pp 31–53
258. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, Boland A, Vronskaya M, van der Lee SJ, Amlie-Wolf A, Bellenguez C, Frizatti A, Chouraki V, Martin ER, Sleegers K, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, Hamilton-Nelson KL, Moreno-Grau S, O'Laso R, Raybould R, Chen Y, Kuzma AB, Hiltunen M, Morgan T, Ahmad S, Vardarajan BN, Epelbaum J, Hoffmann P, Boada M, Beecham GW, Garnier J-G, Harold D, Fitzpatrick AL, Valladares O, Moutet M-L, Gerrish A, Smith A V., Qu L, Bacq D, Denning N, Jian X, Zhao Y, Del Zompo M, Fox NC, Choi S-H, Mateo I, Hughes JT, Adams HH, Malamon J, Sanchez-Garcia F, Patel Y, Brody J a., Dombroski B a., Naranjo MCD, Daniilidou M, Eiriksdottir G, Mukherjee S, Wallon D, Uphill J, Aspelund T, Cantwell LB, Garzia F, Galimberti D, Hofer E, Butkiewicz M, Fin B, Scarpini E, Sarnowski C, Bush WS, Meslage S, Kornhuber J, White CC, Song Y, Barber RC, Engelborghs S, Sordon S, Voijnovic D, Adams PM, Vandenberghe R, Mayhaus M, Cupples LA, Albert MS, De Deyn PP, Gu W, Himali JJ, Beekly D, Squassina A, Hartmann AM, Orellana A, Blacker D, Rodriguez-Rodriguez E, Lovestone S, Garcia ME, Doody RS, Munoz-Fernandez C, Sussams R, Lin H, Fairchild TJ, Benito Y a., Holmes C, Karamujic-Comić H, Frosch

- MP, Thonberg H, Maier W, Roschupkin G, Ghetti B, Giedraitis V, Kawalia A, Li S, Huebinger RM, Kilander L, Moebus S, Hernández I, Kamboh MI, Brundin R, Turton J, Yang Q, Katz MJ, Concaro L, Lord J, Beiser AS, Keene CD, Helisalmi S, Kloszewska I, Kukull W a., Koivisto AM, Lynch A, Tarraga L, Larson EB, Haapasalo A, Lawlor B, Mosley TH, Lipton RB, Solfrizzi V, Gill M, Longstreth WT, Montine TJ, Frisardi V, Diez-Fairen M, Rivadeneira F, Petersen RC, Deramecourt V, Alvarez I, Salani F, Ciaramella A, Boerwinkle E, Reiman EM, Fievet N, Rotter JI, Reisch JS, Hanon O, Cupidi C, Andre Uitterlinden a. G, Royall DR, Dufouil C, Maletta RG, de Rojas I, Sano M, Brice A, Cecchetti R, George-Hyslop PS, Ritchie K, Tzolaki M, Tsuang DW, Dubois B, Craig D, Wu C-K, Soininen H, Avramidou D, Albin RL, Fratiglioni L, Germanou A, Apostolova LG, Keller L, Koutroumani M, Arnold SE, Panza F, Gatzima O, Asthana S, Hannequin D, Whitehead P, Atwood CS, Caffarra P, Hampel H, Quintela I, Carracedo Á, Lannfelt L, Rubinsztein DC, Barnes LL, Pasquier F, Frölich L, Barral S, McGuinness B, Beach TG, Johnston J a., Becker JT, Passmore P, Bigio EH, Schott JM, Bird TD, Warren JD, Boeve BF, Lupton MK, Bowen JD, Proitsi P, Boxer A, Powell JF, Burke JR, Kauwe JSK, Burns JM, Mancuso M, Buxbaum JD, Bonuccelli U, Cairns NJ, McQuillin A, Cao C, Livingston G, Carlson CS, Bass NJ, Carlsson CM, Hardy J, Carney RM, Bras J, Carrasquillo MM, Guerreiro R, Allen M, Chui HC, Fisher E, Masullo C, Crocco E a., DeCarli C, Bisceglia G, Dick M, Ma L, Duara R, Graff-Radford NR, Evans D a., Hodges A, Faber KM, Scherer M, Fallon KB, Riemenschneider M, Fardo DW, Heun R, Farlow MR, Kölsch H, Ferris S, Leber M, Foroud TM, Heuser I, Galasko DR, Giegling I, Gearing M, Hüll M, Geschwind DH, Gilbert JR, Morris J, Green RC, Mayo K, Growdon JH, Feulner T, Hamilton RL, Harrell LE, Drichel D, Honig LS, Cushion TD, Huentelman MJ, Hollingworth P, Hulette CM, Hyman BT, Marshall R, Jarvik GP, Meggy A, Abner E, Menzies GE, Jin L-W, Leonenko G, Real LM, Jun GR, Baldwin CT, Grozeva D, Karydas A, Russo G, Kaye J a., Kim R, Jessen F, Kowall NW, Vellas B, Kramer JH, Vardy E, LaFerla FM, Jöckel K-H, Lah JJ, Dichgans M, Leverenz JB, Mann D, Levey AI, Pickering-Brown S, Lieberman AP, Klopp N, Lunetta KL, Wichmann H-E, Lyketsos CG, Morgan K, Marson DC, Brown K, Martiniuk F, Medway C, Mash DC, Nöthen MM, Masliah E, Hooper NM, McCormick WC, Daniele A, McCurry SM, Bayer A, McDavid AN, Gallacher J, McKee AC, van den Bussche H, Mesulam M, Brayne C, Miller BL, Riedel-Heller S, Miller C a., Miller JW, Al-Chalabi A, Morris JC, Shaw CE, Myers AJ, Wiltfang J, O'Bryant S, Olichney JM, Alvarez V, Parisi JE, Singleton AB, Paulson HL, Collinge J, Perry WR, Mead S, Peskind E, Cribbs DH, Rossor M, Pierce A, Ryan NS, Poon WW, Nacmias B, Potter H, Sorbi S, Quinn JF, Sacchinelli E, Raj A, Spalletta G, Raskind M, Caltagirone C, Bossù P, Orfei MD, Reisberg B, Clarke R, Reitz C, Smith a D, Ringman JM, Warden D, Roberson ED, Wilcock G, Rogaeve E, Bruni AC, Rosen HJ, Gallo M, Rosenberg RN, Ben-Shlomo Y, Sager M a., Mecocci P, Saykin AJ, Pastor P, Cuccaro ML, Vance JM, Schneider J a., Schneider LS, Slifer S, Seeley WW, Smith AG, Sonnen J a., Spina S, Stern R a., Swerdlow RH, Tang M, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Van Eldik LJ, Vinters H V., Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer K a., Wilhelmsen KC, Williamson J, Wingo TS, Woltjer RL, Wright CB, Yu C-E, Yu L, Saba Y, Pilotto A, Bullido MJ, Peters O, Crane PK, Bennett D, Bosco P, Coto E, Boccardi V, De Jager PL, Lleo A, Warner N, Lopez OL, Ingelsson M, Deloukas P, Cruchaga C, Graff C, Gwilliam R, Fornage M, Goate AM, Sanchez-Juan P, Kehoe PG, Amin N, Ertekin-Taner N, Berr C, DeBette S, Love S, Launer LJ, Younkin SG, Dartigues J-F, Corcoran C, Ikram MA, Dickson DW, Nicolas G, Campion D, Tschanz J, Schmidt H, Hakonarson H, Clarimon J, Munger R, Schmidt R, Farrer L a., Van Broeckhoven C, C. O'Donovan M, DeStefano AL, Jones L, Haines JL, Deleuze J-F, Owen MJ, Gudnason V, Mayeux R, Escott-Price V, Psaty BM, Ramirez A, Wang L-S, Ruiz A, van Duijn CM, Holmans P a., Seshadri S, Williams J, Amouyel P, Schellenberg GD, Lambert J-C, Pericak-Vance M a. (2019) Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet* 51:414–430. doi: 10.1038/s41588-019-0358-2
259. Kuo CT, Jan LY, Jan YN (2005) Dendrite-specific remodeling of *Drosophila* sensory neurons requires matrix metalloproteases, ubiquitin-proteasome, and ecdysone signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102:15230–15235. doi: 10.1073/pnas.0507393102
260. 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 IC, Rousseau F, Schymkowitz J, De Strooper B (2010) Neurotoxicity of Alzheimer's disease A $\beta$  peptides is



- induced by small changes in the A $\beta$ 42 to A $\beta$ 40 ratio. *EMBO J* 29:3408–3420. doi: 10.1038/emboj.2010.211
261. Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy EA, Paquet D, Duffield M, Fak J, Olsen O, Darnell RB, Tessier-Lavigne M (2019) A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP  $\beta$ -CTFs, Not A $\beta$ . *Neuron* 104:256-270.e5. doi: 10.1016/j.neuron.2019.07.010
262. Lamb CA, Dooley HC, Tooze SA (2013) Endocytosis and autophagy: Shared machinery for degradation. *BioEssays* 35:34–45. doi: 10.1002/bies.201200130
263. Lambert E, Saha O, Soares Landeira B, Melo de Farias AR, Hermant X, Carrier A, Pelletier A, Gadaut J, Davoine L, Dupont C, Amouyel P, Bonnefond A, Lafont F, Abdelfettah F, Verstreken P, Chapuis J, Barois N, Delahaye F, Dermaut B, Lambert JC, Costa MR, Dourlen P (2022) The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects. *Acta Neuropathol Commun* 10. doi: 10.1186/s40478-021-01285-5
264. Lambert J-C, Amouyel P (2011) Genetics of Alzheimer’s disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* 21:295–301. doi: 10.1016/j.gde.2011.02.002
265. Lambert J-C, Heath S, Even G, Campion D, Sleegers K, Hiltunen M, Combarros O, Zelenika D, Bullido MJ, Tavernier B, Letenneur L, Bettens K, Berr C, Pasquier F, Fiévet N, Barberger-Gateau P, Engelborghs S, De Deyn P, Mateo I, Franck A, Helisalmi S, Porcellini E, Hanon O, de Pancorbo MM, Lendon C, Dufouil C, Jaillard C, Leveillard T, Alvarez V, Bosco P, Mancuso M, Panza F, Nacmias B, Bossù P, Piccardi P, Annoni G, Seripa D, Galimberti D, Hannequin D, Licastro F, Soininen H, Ritchie K, Blanché H, Dartigues J-F, Tzourio C, Gut I, Van Broeckhoven C, Alperovitch A, Lathrop M, Amouyel P (2009) Genome-wide association study identifies variants at CLU and CR1 associated with Alzheimer’s disease. *Nat Genet* 41:1094–1099. doi: 10.1038/ng.439
266. Lambert JC, Ibrahim-Verbaas C a., Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C, Jun G, DeStefano AL, Bis JC, Beecham GW, Grenier-Boley B, Russo G, Thornton-Wells T a., Jones N, Smith A V., Chouraki V, Thomas C, Ikram MA, Zelenika D, Vardarajan BN, Kamatani Y, Lin CF, Gerrish A, Schmidt H, Kunkle B, Fiévet N, Amouyel P, Pasquier F, Deramecourt V, De Bruijn RF a. G, Amin N, Hofman A, Van Duijn CM, Dunstan ML, Hollingworth P, Owen MJ, O’Donovan MC, Jones L, Holmans P a., Moskvina V, Williams J, Baldwin C, Farrer L a., Choi SH, Lunetta KL, Fitzpatrick AL, Harris TB, Psaty BM, Gilbert JR, Hamilton-Nelson KL, Martin ER, Pericak-Vance M a., Haines JL, Gudnason V, Jonsson P V., Eiriksdottir G, Bihoreau MT, Lathrop M, Valladares O, Cantwell LB, Wang LS, Schellenberg GD, Ruiz A, Boada M, Reitz C, Mayeux R, Ramirez A, Maier W, Hanon O, Kukull W a., Buxbaum JD, Campion D, Wallon D, Hannequin D, Crane PK, Larson EB, Becker T, Cruchaga C, Goate AM, Craig D, Johnston J a., Mc-Guinness B, Todd S, Passmore P, Berr C, Ritchie K, Lopez OL, De Jager PL, Evans D, Lovestone S, Proitsi P, Powell JF, Letenneur L, Barberger-Gateau P, Dufouil C, Dartigues JF, Morón FJ, Rubinsztein DC, St. George-Hyslop P, Sleegers K, Bettens K, Van Broeckhoven C, Huentelman MJ, Gill M, Brown K, Morgan K, Kamboh MI, Keller L, Fratiglioni L, Green R, Myers AJ, Love S, Rogaeva E, Gallacher J, Bayer A, Clarimon J, Lleo A, Tsuang DW, Yu L, Bennett D a., Tsolaki M, Bossù P, Spalletta G, Collinge J, Mead S, Sorbi S, Nacmias B, Sanchez-Garcia F, Deniz Naranjo MC, Fox NC, Hardy J, Bosco P, Clarke R, Brayne C, Galimberti D, Mancuso M, Matthews F, Moebus S, Mecocci P, Del Zompo M, Hampel H, Pilotto A, Bullido M, Panza F, Caffarra P, Mayhaus M, Pichler S, Gu W, Riemenschneider M, Lannfelt L, Ingelsson M, Hakonarson H, Carrasquillo MM, Zou F, Younkin SG, Beekly D, Alvarez V, Coto E, Razquin C, Pastor P, Mateo I, Combarros O, Faber KM, Foroud TM, Soininen H, Hiltunen M, Blacker D, Mosley TH, Graff C, Holmes C, Montine TJ, Rotter JI, Brice A, Nalls M a., Kauwe JSK, Boerwinkle E, Schmidt R, Rujescu D, Tzourio C, Nöthen MM, Launer LJ, Seshadri S (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer’s disease. *Nat Genet* 45:1452–1458. doi: 10.1038/ng.2802
267. Langer F, Eisele YS, Fritschi SK, Staufenbiel M, Walker LC, Jucker M (2011) Soluble A $\beta$  Seeds Are Potent Inducers of Cerebral  $\beta$ -Amyloid Deposition. *The Journal of Neuroscience* 31:14488–14495. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3088-11.2011

268. Lasorsa A, Malki I, Cantrelle FX, Merzougui H, Boll E, Lambert JC, Landrieu I (2018) Structural basis of tau interaction with BIN1 and regulation by tau phosphorylation. *Front Mol Neurosci* 11. doi: 10.3389/fnmol.2018.00421
269. Lauwers E, Wang YC, Gallardo R, Van der Kant R, Michiels E, Swerts J, Baatsen P, Zaiter SS, McAlpine SR, Gounko N V., Rousseau F, Schymkowitz J, Verstreken P (2018) Hsp90 Mediates Membrane Deformation and Exosome Release. *Mol Cell* 71:689-702.e9. doi: 10.1016/j.molcel.2018.07.016
270. Lee E, Marcucci M, Daniell L, Pypaert M, Weisz OA, Ochoa G-C, Farsad K, Wenk MR, De Camilli P (2002) Amphiphysin 2 (Bin1) and T-Tubule Biogenesis in Muscle. *Science* (1979) 297:1193–1196. doi: 10.1126/science.1071362
271. Lee JH, Cheng R, Barral S, Reitz C, Medrano M, Lantigua R, Jiménez-Velazquez IZ, Rogaeva E, St. George-Hyslop PH, Mayeux R (2011) Identification of Novel Loci for Alzheimer Disease and Replication of CLU, PICALM, and BIN1 in Caribbean Hispanic Individuals. *Arch Neurol* 68. doi: 10.1001/archneurol.2010.292
272. Lee LA, Orr-Weaver TL (2003) Regulation of Cell Cycles in *Drosophila* Development: Intrinsic and Extrinsic Cues. *Annu Rev Genet* 37:545–578. doi: 10.1146/annurev.genet.37.110801.143149
273. Lee T, Lee A, Luo L (1999) Development of the *Drosophila* mushroom bodies: sequential generation of three distinct types of neurons from a neuroblast. *Development* 126:4065–4076. doi: 10.1242/dev.126.18.4065
274. Lee VM-Y, Balin BJ, Otvos L, Trojanowski JQ (1991) A68: a Major Subunit of Paired Helical Filaments and Derivatized Forms of Normal Tau. *Science* (1979) 251:675–678. doi: 10.1126/science.1899488
275. Leprince C, Romero F, Cussac D, Vayssiere B, Berger R, Tavitian A, Camonis JH (1997) A New Member of the Amphiphysin Family Connecting Endocytosis and Signal Transduction Pathways. *Journal of Biological Chemistry* 272:15101–15105. doi: 10.1074/jbc.272.24.15101
276. Leprince C, Le Scolan E, Meunier B, Fraissier V, Brandon N, De Gunzburg J, Camonis J (2003) Sorting nexin 4 and amphiphysin 2, a new partnership between endocytosis and intracellular trafficking. *J Cell Sci* 116:1937–1948. doi: 10.1242/jcs.00403
277. Letenneur L, Gilleron V, Commenges D, Helmer C, Orgogozo JM, Dartigues JF (1999) Are sex and educational level independent predictors of dementia and Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 66:177–183. doi: 10.1136/jnnp.66.2.177
278. Leventis PA, Chow BM, Stewart BA, Iyengar B, Campos AR, Boulianne GL (2001) *Drosophila* amphiphysin is a post-synaptic protein required for normal locomotion but not endocytosis. *Traffic* 2:839–850. doi: 10.1034/j.1600-0854.2001.21113.x
279. Li C, Shah SZA, Zhao D, Yang L (2016) Role of the Retromer Complex in Neurodegenerative Diseases. *Front Aging Neurosci* 8. doi: 10.3389/fnagi.2016.00042
280. Li J, Ashley J, Budnik V, Bhat MA (2007) Crucial Role of *Drosophila* Neurexin in Proper Active Zone Apposition to Postsynaptic Densities, Synaptic Growth, and Synaptic Transmission. *Neuron* 55:741–755. doi: 10.1016/j.neuron.2007.08.002
281. Li R, Cui J, Shen Y (2014) Brain sex matters: Estrogen in cognition and Alzheimer's disease. *Mol Cell Endocrinol* 389:13–21. doi: 10.1016/j.mce.2013.12.018
282. Li X, DiFiglia M (2012) The recycling endosome and its role in neurological disorders. *Prog Neurobiol* 97:127–141. doi: 10.1016/j.pneurobio.2011.10.002
283. Liao F, Jiang H, Srivatsan S, Xiao Q, Lefton KB, Yamada K, Mahan TE, Lee J-M, Shaw AS, Holtzman DM (2015) Effects of CD2-associated protein deficiency on amyloid- $\beta$  in neuroblastoma cells and in an APP transgenic mouse model. *Mol Neurodegener* 10:12. doi: 10.1186/s13024-015-0006-y
284. Lindwall G, Cole RD (1984) Phosphorylation affects the ability of tau protein to promote microtubule assembly. *J Biol Chem* 259:5301–5
285. Liu Z, Chen Y, Wang D, Wang S, Zhang YQ (2010) Distinct Presynaptic and Postsynaptic Dismantling Processes of *Drosophila* Neuromuscular Junctions during Metamorphosis. *The Journal of Neuroscience* 30:11624–11634. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0410-10.2010

286. López-Arias B, Turiégano E, Monedero I, Canal I, Torroja L (2017) Presynaptic A $\beta$ 40 prevents synapse addition in the adult *Drosophila* neuromuscular junction. *PLoS One* 12:e0177541. doi: 10.1371/journal.pone.0177541
287. Lu DC, Rabizadeh S, Chandra S, Shayya RF, Ellerby LM, Ye X, Salvesen GS, Koo EH, Bredesen DE (2000) A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid  $\beta$ -protein precursor. *Nat Med* 6:397–404. doi: 10.1038/74656
288. Lu L, Yao Q-Y, Ruan S-S, Hu J-W, Long W-J, Dai W-Z, Ma T, Zhu X-C (2021) Explore the role of CR1 genetic variants in late-onset Alzheimer’s disease susceptibility. *Psychiatr Genet* 31:216–229. doi: 10.1097/YPG.0000000000000291
289. Mairet-Coello G, Courchet J, Pieraut S, Courchet V, Maximov A, Polleux F (2013) The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of A $\beta$  Oligomers through Tau Phosphorylation. *Neuron* 78:94–108. doi: 10.1016/j.neuron.2013.02.003
290. Malik M, Simpson JF, Parikh I, Wilfred BR, Fardo DW, Nelson PT, Estus S (2013) CD33 Alzheimer’s Risk-Altering Polymorphism, CD33 Expression, and Exon 2 Splicing. *The Journal of Neuroscience* 33:13320–13325. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1224-13.2013
291. Malki I, Cantrelle FX, Sottejeau Y, Lippens G, Lambert JC, Landrieu I (2017) Regulation of the interaction between the neuronal BIN1 isoform 1 and Tau proteins – role of the SH3 domain. *FEBS Journal* 284:3218–3229. doi: 10.1111/febs.14185
292. Mao N-C, Steingrimsson E, DuHadaway J, Wasserman W, Ruiz JC, Copeland NG, Jenkins NA, Prendergast GC (1999) The Murine Bin1 Gene Functions Early in Myogenesis and Defines a New Region of Synteny between Mouse Chromosome 18 and Human Chromosome 2. *Genomics* 56:51–58. doi: 10.1006/geno.1998.5709
293. Marks B, McMahon HT (1998) Calcium triggers calcineurin-dependent synaptic vesicle recycling in mammalian nerve terminals. *Current Biology* 8:740–749. doi: 10.1016/S0960-9822(98)70297-0
294. Marques-Coelho D, Iohan L da CC, Melo de Farias AR, Flaig A, Letournel F, Martin-Négrier M-L, Chapon F, Faisant M, Godfraind C, Maurage C-A, Deramecourt V, Duchesne M, Meyronnet D, Streichenberger N, de Paula AM, Rigau V, Vandenbos-Burel F, Duyckaerts C, Seilhean D, Milin S, Chiforeanu DC, Laquerrière A, Marguet F, Lannes B, Lambert J-C, Costa MR (2021) Differential transcript usage unravels gene expression alterations in Alzheimer’s disease human brains. *NPJ Aging Mech Dis* 7:2. doi: 10.1038/s41514-020-00052-5
295. Mathew D, Popescu A, Budnik V (2003) *Drosophila* amphiphysin functions during synaptic Fasciclin II membrane cycling. *J Neurosci* 23:10710–6
296. Matthews KA, Kaufman TC, Gelbart WM (2005) Research resources for *Drosophila*: the expanding universe. *Nat Rev Genet* 6:179–193. doi: 10.1038/nrg1554
297. Mauvezin C, Nagy P, Juhász G, Neufeld TP (2015) Autophagosome-lysosome fusion is independent of V-ATPase-mediated acidification. *Nat Commun* 6. doi: 10.1038/ncomms8007
298. McAvoy KM, Sait HR, Marsh G, Peterson M, Reynolds TL, Gagnon J, Geisler S, Leach P, Roberts C, Cahir-McFarland E, Ransohoff RM, Crotti A (2019) Cell-autonomous and non-cell autonomous effects of neuronal BIN1 loss in vivo. *PLoS One* 14:1–28. doi: 10.1371/journal.pone.0220125
299. McKenzie AT, Moyon S, Wang M, Katsyv I, Song W-M, Zhou X, Dammer EB, Duong DM, Aaker J, Zhao Y, Beckmann N, Wang P, Zhu J, Lah JJ, Seyfried NT, Levey AI, Katsel P, Haroutunian V, Schadt EE, Popko B, Casaccia P, Zhang B (2017) Multiscale network modeling of oligodendrocytes reveals molecular components of myelin dysregulation in Alzheimer’s disease. *Mol Neurodegener* 12:82. doi: 10.1186/s13024-017-0219-3
300. McMahon HT, Wigge P, Smith C (1997) Clathrin interacts specifically with amphiphysin and is displaced by dynamin. *FEBS Lett* 413:319–322. doi: 10.1016/S0014-5793(97)00928-9
301. McMillan P, Korvatska E, Poorkaj P, Evstafjeva Z, Robinson L, Greenup L, Leverenz J, Schellenberg GD, D’Souza I (2008) Tau isoform regulation is region- and cell-specific in mouse brain. *J Comp Neurol* 511:788–803. doi: 10.1002/cne.21867

302. McPherson PS, Garcia EP, Slepnev VI, David C, Zhang X, Grabs D, Sossini WS, Bauerfeind R, Nemoto Y, De Camilli P (1996) A presynaptic inositol-5-phosphatase. *Nature* 379:353–357. doi: 10.1038/379353a0
303. Menon KP, Carrillo RA, Zinn K (2013) Development and plasticity of the *Drosophila* larval neuromuscular junction. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol* 2:647–670
304. Meunier B, Quaranta M, Daviet L, Hatzoglou A, Leprince C (2009) The membrane-tubulating potential of amphiphysin 2/BIN1 is dependent on the microtubule-binding cytoplasmic linker protein 170 (CLIP-170). *Eur J Cell Biol* 88:91–102. doi: 10.1016/j.ejcb.2008.08.006
305. Mhatre SD, Paddock BE, Saunders AJ, Marena DR (2012) Invertebrate Models of Alzheimer’s Disease. *Journal of Alzheimer’s Disease* 33:3–16. doi: 10.3233/JAD-2012-121204
306. Mhatre SD, Satyasi V, Killen M, Paddock BE, Moir RD, Saunders AJ, Marena DR (2014) Altered synapses in a *Drosophila* model of Alzheimer’s disease. *Dis Model Mech*. doi: 10.1242/dmm.012104
307. Micheva KD, Kay BK, McPherson PS (2002) Synaptojanin Forms Two Separate Complexes in the Nerve Terminal. *Journal of Biological Chemistry* 272:27239–27245. doi: 10.1074/jbc.272.43.27239
308. Micheva KD, Ramjaun AR, Kay BK, McPherson PS (1997) SH3 domain-dependent interactions of endophilin with amphiphysin. *FEBS Lett* 414:308–312. doi: 10.1016/S0014-5793(97)01016-8
309. Miranda AM, Herman M, Cheng R, Nahmani E, Barrett G, Micevska E, Fontaine G, Potier M-C, Head E, Schmitt FA, Lott IT, Jiménez-Velázquez IZ, Antonarakis SE, Di Paolo G, Lee JH, Hussaini SA, Marquer C (2018) Excess Synaptojanin 1 Contributes to Place Cell Dysfunction and Memory Deficits in the Aging Hippocampus in Three Types of Alzheimer’s Disease. *Cell Rep* 23:2967–2975. doi: 10.1016/j.celrep.2018.05.011
310. Miyagawa T, Ebinuma I, Morohashi Y, Hori Y, Young Chang M, Hattori H, Maehara T, Yokoshima S, Fukuyama T, Tsuji S, Iwatsubo T, Prendergast GC, Tomita T (2016) BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- $\beta$  production. *Hum Mol Genet* 25:2948–2958. doi: 10.1093/hmg/ddw146
311. Modrego P, Lobo A (2019) A good marker does not mean a good target for clinical trials in Alzheimer’s disease: the amyloid hypothesis questioned. *Neurodegener Dis Manag* 9:119–121. doi: 10.2217/nmt-2019-0006
312. Mondragón-Rodríguez S, Trillaud-Doppia E, Dudilot A, Bourgeois C, Lauzon M, Leclerc N, Boehm J (2012) Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-d-aspartate Receptor-dependent Tau Phosphorylation. *Journal of Biological Chemistry* 287:32040–32053. doi: 10.1074/jbc.M112.401240
313. Moreau K, Fleming A, Imarisio S, Lopez Ramirez A, Mercer JL, Jimenez-Sanchez M, Bento CF, Puri C, Zavodszky E, Siddiqi F, Lavau CP, Betton M, O’Kane CJ, Wechsler DS, Rubinsztein DC (2014) PICALM modulates autophagy activity and tau accumulation. *Nat Commun* 5:4998. doi: 10.1038/ncomms5998
314. Morgan TH (1910) Sex Limited Inheritance in *Drosophila*. *Science* (1979) 32:120–122. doi: 10.1126/science.32.812.120
315. Morris M, Maeda S, Vossel K, Mucke L (2011) The Many Faces of Tau. *Neuron* 70:410–426. doi: 10.1016/j.neuron.2011.04.009
316. Muller AJ, Baker JF, DuHadaway JB, Ge K, Farmer G, Donover PS, Meade R, Reid C, Grzanna R, Roach AH, Shah N, Soler AP, Prendergast GC (2003) Targeted Disruption of the Murine *Bin1/Amphiphysin II* Gene Does Not Disable Endocytosis but Results in Embryonic Cardiomyopathy with Aberrant Myofibril Formation. *Mol Cell Biol* 23:4295–4306. doi: 10.1128/MCB.23.12.4295-4306.2003
317. Munn AL, Stevenson BJ, Geli MI, Riezman H (1995) end5, end6, and end7: mutations that cause actin delocalization and block the internalization step of endocytosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 6:1721–1742. doi: 10.1091/mbc.6.12.1721
318. Murray ME, Kouri N, Lin W-L, Jack CR, Dickson DW, Vemuri P (2014) Clinicopathologic assessment and imaging of tauopathies in neurodegenerative dementias. *Alzheimers Res Ther* 6:1. doi: 10.1186/alzrt231
319. Nahm M, Long AA, Paik SK, Kim S, Bae YC, Broadie K, Lee S (2010) The Cdc42-selective GAP Rich regulates postsynaptic development and retrograde BMP transsynaptic signaling. *Journal of Cell Biology* 191:661–675. doi: 10.1083/jcb.201007086

320. Naj AC, Jun G, Beecham GW, Wang L-S, Vardarajan BN, Buross J, Gallins PJ, Buxbaum JD, Jarvik GP, Crane PK, Larson EB, Bird TD, Boeve BF, Graff-Radford NR, De Jager PL, Evans D, Schneider JA, Carrasquillo MM, Ertekin-Taner N, Younkin SG, Cruchaga C, Kauwe JSK, Nowotny P, Kramer P, Hardy J, Huentelman MJ, Myers AJ, Barmada MM, Demirci FY, Baldwin CT, Green RC, Rogava E, George-Hyslop PS, Arnold SE, Barber R, Beach T, Bigio EH, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Cairns NJ, Carlson CS, Carney RM, Carroll SL, Chui HC, Clark DG, Corneveaux J, Cotman CW, Cummings JL, DeCarli C, DeKosky ST, Diaz-Arrastia R, Dick M, Dickson DW, Ellis WG, Faber KM, Fallon KB, Farlow MR, Ferris S, Frosch MP, Galasko DR, Ganguli M, Gearing M, Geschwind DH, Ghetti B, Gilbert JR, Gilman S, Giordani B, Glass JD, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Head E, Honig LS, Hulette CM, Hyman BT, Jicha GA, Jin L-W, Johnson N, Karlawish J, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Koo EH, Kowall NW, Lah JJ, Levey AI, Lieberman AP, Lopez OL, Mack WJ, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Parisi JE, Perl DP, Peskind E, Petersen RC, Poon WW, Quinn JF, Rajbhandary RA, Raskind M, Reisberg B, Ringman JM, Roberson ED, Rosenberg RN, Sano M, Schneider LS, Seeley W, Shelanski ML, Slifer MA, Smith CD, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Tanzi RE, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Vinters H V, Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Williamson J, Woltjer RL, Cantwell LB, Dombroski BA, Beekly D, Lunetta KL, Martin ER, Kambouh MI, Saykin AJ, Reiman EM, Bennett DA, Morris JC, Montine TJ, Goate AM, Blacker D, Tsuang DW, Hakonarson H, Kukull WA, Foroud TM, Haines JL, Mayeux R, Pericak-Vance MA, Farrer LA, Schellenberg GD (2011) Common variants at MS4A4/MS4A6E, CD2AP, CD33 and EPHA1 are associated with late-onset Alzheimer's disease. *Nat Genet* 43:436–441. doi: 10.1038/ng.801
321. Nakajo A, Yoshimura S ichiro, Togawa H, Kunii M, Iwano T, Izumi A, Noguchi Y, Watanabe A, Goto A, Sato T, Harada A (2016) EHBP1L1 coordinates Rab8 and Bin1 to regulate apical-directed transport in polarized epithelial cells. *Journal of Cell Biology* 212:297–306. doi: 10.1083/jcb.201508086
322. Narayan P, Sienski G, Bonner JM, Lin Y-T, Seo J, Baru V, Haque A, Milo B, Akay LA, Graziosi A, Freyzon Y, Landgraf D, Hesse WR, Valastyan J, Barrasa MI, Tsai L-H, Lindquist S (2020) PICALM Rescues Endocytic Defects Caused by the Alzheimer's Disease Risk Factor APOE4. *Cell Rep* 33:108224. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108224
323. Neefjes J, van der Kant R (2014) Stuck in traffic: an emerging theme in diseases of the nervous system. *Trends Neurosci* 37:66–76. doi: 10.1016/j.tins.2013.11.006
324. Negorev D, Riethman H, Wechsler-Reya R, Sakamuro D, Prendergast GC, Simon D (1996) The Bin1 Gene Localizes to Human Chromosome 2q14 by PCR Analysis of Somatic Cell Hybrids and Fluorescence in Situ Hybridization. *Genomics* 33:329–331. doi: 10.1006/geno.1996.0205
325. Neve RL, Harris P, Kosik KS, Kurnit DM, Donlon TA (1986) Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau and chromosomal localization of the genes for tau and microtubule-associated protein 2. *Molecular Brain Research* 1:271–280. doi: 10.1016/0169-328X(86)90033-1
326. Nhan HS, Chiang K, Koo EH (2015) The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol* 129:1–19. doi: 10.1007/s00401-014-1347-2
327. Nicot A-S, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E, Kingston H, Garnier J-M, Biancalana V, Oldfors A, Mandel J-L, Laporte J (2007) Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 39:1134–1139. doi: 10.1038/ng2086
328. Nisbet RM, Polanco J-C, Ittner LM, Götz J (2015) Tau aggregation and its interplay with amyloid- $\beta$ . *Acta Neuropathol* 129:207–220. doi: 10.1007/s00401-014-1371-2
329. Nishitsuji K, Tomiyama T, Ishibashi K, Ito K, Teraoka R, Lambert MP, Klein WL, Mori H (2009) The E693 $\Delta$  Mutation in Amyloid Precursor Protein Increases Intracellular Accumulation of Amyloid  $\beta$  Oligomers and Causes Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis in Cultured Cells. *Am J Pathol* 174:957–969. doi: 10.2353/ajpath.2009.080480
330. Nixon R a. (2017) Amyloid precursor protein & endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: Inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB Journal* 31:2729–2743. doi: 10.1096/fj.201700359

331. Nixon RA, Yang D-S (2011) Autophagy failure in Alzheimer's disease—locating the primary defect. *Neurobiol Dis* 43:38–45. doi: 10.1016/j.nbd.2011.01.021
332. Nott A, Holtman IR, Coufal NG, Schlachetzki JCM, Yu M, Hu R, Han CZ, Pena M, Xiao J, Wu Y, Keulen Z, Pasillas MP, O'Connor C, Nickl CK, Schafer ST, Shen Z, Rissman RA, Brewer JB, Gosselin D, Gonda DD, Levy ML, Rosenfeld MG, McVicker G, Gage FH, Ren B, Glass CK (2019) Brain cell type-specific enhancer-promoter interactome maps and disease risk association. *Science* 0793:1–12. doi: 10.1126/science.aay0793
333. Novikova G, Kapoor M, Tcw J, Abud EM, Efthymiou AG, Chen SX, Cheng H, Fullard JF, Bendl J, Liu Y, Roussos P, Björkegren JL, Liu Y, Poon WW, Hao K, Marcora E, Goate AM (2021) Integration of Alzheimer's disease genetics and myeloid genomics identifies disease risk regulatory elements and genes. *Nat Commun* 12. doi: 10.1038/s41467-021-21823-y
334. NUKINA N, IHARA Y (1986) One of the Antigenic Determinants of Paired Helical Filaments Is Related to Tau Protein1. *The Journal of Biochemistry* 99:1541–1544. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135625
335. Oblinger M, Argasinski A, Wong J, Kosik K (1991) Tau gene expression in rat sensory neurons during development and regeneration. *The Journal of Neuroscience* 11:2453–2459. doi: 10.1523/JNEUROSCI.11-08-02453.1991
336. O'Brien RJ, Wong PC (2011) Amyloid Precursor Protein Processing and Alzheimer's Disease. *Annu Rev Neurosci* 34:185–204. doi: 10.1146/annurev-neuro-061010-113613
337. O'Connor-Giles KM, Ho LL, Ganetzky B (2008) Nervous Wreck Interacts with Thickveins and the Endocytic Machinery to Attenuate Retrograde BMP Signaling during Synaptic Growth. *Neuron* 58:507–518. doi: 10.1016/j.neuron.2008.03.007
338. Ojelade SA, Lee T V., Giagtzoglou N, Yu L, Ugur B, Li Y, Duraine L, Zuo Z, Petyuk V, De Jager PL, Bennett DA, Arenkiel BR, Bellen HJ, Shulman JM (2019) cindr, the Drosophila Homolog of the CD2AP Alzheimer's Disease Risk Gene, Is Required for Synaptic Transmission and Proteostasis. *Cell Rep* 28:1799–1813.e5. doi: 10.1016/j.celrep.2019.07.041
339. Olsson F, Schmidt S, Althoff V, Munter LM, Jin S, Rosqvist S, Lendahl U, Multhaup G, Lundkvist J (2014) Characterization of Intermediate Steps in Amyloid Beta (A $\beta$ ) Production under Near-native Conditions. *Journal of Biological Chemistry* 289:1540–1550. doi: 10.1074/jbc.M113.498246
340. Owen DJ, Wigge P, Vallis Y, Moore JDA, Evans PR, McMahon HT (1998) Crystal structure of the amphiphysin-2 SH3 domain and its role in the prevention of dynamin ring formation. *EMBO J* 17:5273–5285. doi: 10.1093/emboj/17.18.5273
341. Pagano K, Galante D, D'Arrigo C, Corsaro A, Nizzari M, Florio T, Molinari H, Tomaselli S, Ragona L (2019) Effects of Prion Protein on A $\beta$ 42 and Pyroglutamate-Modified A $\beta$ pE3-42 Oligomerization and Toxicity. *Mol Neurobiol* 56:1957–1971. doi: 10.1007/s12035-018-1202-x
342. Pan K, Liang X, Zhang H, Zhao J, Wang D, Li J, Lian Q, Chang AE, Li Q, Xia J (2012) Characterization of Bridging Integrator 1 (BIN1) as a Potential Tumor Suppressor and Prognostic Marker in Hepatocellular Carcinoma. *Molecular Medicine* 18:507–518. doi: 10.2119/molmed.2011.00319
343. Pant S, Sharma M, Patel K, Caplan S, Carr C, Grant B (2009) AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 functions with RME-1/Ehd in endocytic recycling. *11:1399–1410*. doi: 10.4172/2157-7633.1000305.Improved
344. Panza F, Lozupone M, Logroscino G, Imbimbo BP (2019) A critical appraisal of amyloid- $\beta$ -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat Rev Neurol* 15:73–88. doi: 10.1038/s41582-018-0116-6
345. Di Paolo G, Sankaranarayanan S, Wenk MR, Daniell L, Perucco E, Caldarone BJ, Flavell R, Picciotto MR, Ryan TA, Cremona O, De Camilli P (2002) Decreased Synaptic Vesicle Recycling Efficiency and Cognitive Deficits in Amphiphysin 1 Knockout Mice. *Neuron* 33:789–804. doi: 10.1016/S0896-6273(02)00601-3
346. Parikh I, Fardo DW, Estus S (2014) Genetics of PICALM Expression and Alzheimer's Disease. *PLoS One* 9:e91242. doi: 10.1371/journal.pone.0091242
347. Park S-K, Ratia K, Ba M, Valencik M, Liebman S (2016) Inhibition of A $\beta$ 42 oligomerization in yeast by a PICALM ortholog and certain FDA approved drugs. *Microbial Cell* 3:53–64. doi: 10.15698/mic2016.02.476

348. Pastor-Pareja JC, Xu T (2013) Dissecting Social Cell Biology and Tumors Using *Drosophila* Genetics. *Annu Rev Genet* 47:51–74. doi: 10.1146/annurev-genet-110711-155414
349. Pensalfini A, Jiang Y, Kim S, Nixon RA (2021) Assessing Rab5 Activation in Health and Disease. pp 273–294
350. Pensalfini A, Kim S, Subbanna S, Bleiwas C, Goulbourne CN, Stavrides PH, Jiang Y, Lee J-H, Darji S, Pawlik M, Huo C, Peddy J, Berg MJ, Smiley JF, Basavarajappa BS, Nixon RA (2020) Endosomal Dysfunction Induced by Directly Overactivating Rab5 Recapitulates Prodromal and Neurodegenerative Features of Alzheimer’s Disease. *Cell Rep* 33:108420. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108420
351. Perdigão C, Barata MA, Araújo MN, Mirfakhar FS, Castanheira J, Guimas Almeida C (2020) Intracellular Trafficking Mechanisms of Synaptic Dysfunction in Alzheimer’s Disease. *Front Cell Neurosci* 14
352. Peric A, Annaert W (2015) Early etiology of Alzheimer’s disease: tipping the balance toward autophagy or endosomal dysfunction? *Acta Neuropathol* 129:363–381. doi: 10.1007/s00401-014-1379-7
353. Peter BJ, Kent HM, Mills IG, Vallis Y, Butler PJG, Evans PR, McMahon HT (2004) BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* (1979) 303:495–499. doi: 10.1126/science.1092586
354. Piaceri I (2013) Genetics of familial and sporadic Alzheimer’s disease. *Frontiers in Bioscience* E5:E605. doi: 10.2741/E605
355. Piccioli ZD, Littleton JT (2014) Retrograde BMP Signaling Modulates Rapid Activity-Dependent Synaptic Growth via Presynaptic LIM Kinase Regulation of Cofilin. *The Journal of Neuroscience* 34:4371–4381. doi: 10.1523/JNEUROSCI.4943-13.2014
356. Pichaud F, Desplan C (2001) A new visualization approach for identifying mutations that affect differentiation and organization of the *Drosophila* ommatidia. *Development* 128:815–26
357. St. Pierre SE, Ponting L, Stefancsik R, McQuilton P (2014) FlyBase 102—advanced approaches to interrogating FlyBase. *Nucleic Acids Res* 42:D780–D788. doi: 10.1093/nar/gkt1092
358. Ponnusamy M, Wang S, Yuksel M, Hansen MT, Blazier DM, McMillan JD, Zhang X, Dammer EB, Collier L, Thinakaran G (2022) Loss of forebrain BIN1 attenuates hippocampal pathology and neuroinflammation in a tauopathy model. *Brain*. doi: 10.1093/brain/awac318
359. Pooler AM, Polydoro M, Wegmann S, Nicholls SB, Spires-Jones TL, Hyman BT (2013) Propagation of tau pathology in Alzheimer’s disease: identification of novel therapeutic targets. *Alzheimers Res Ther* 5:49. doi: 10.1186/alzrt214
360. Posey AD, Swanson KE, Alvarez MG, Krishnan S, Earley JU, Band H, Pytel P, McNally EM, Demonbreun AR (2014) EHD1 mediates vesicle trafficking required for normal muscle growth and transverse tubule development. *Dev Biol* 387:179–190. doi: 10.1016/j.ydbio.2014.01.004
361. Pozueta J, Lefort R, Shelanski ML (2013) Synaptic changes in Alzheimer’s disease and its models. *Neuroscience* 251:51–65. doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.05.050
362. Prasher VP, Farrer MJ, Kessling AM, Fisher EMC, West RJ, Barber PC, Butler AC (1998) Molecular mapping of alzheimer-type dementia in Down’s syndrome. *Ann Neurol* 43:380–383. doi: 10.1002/ana.410430316
363. Prendergast GC, Muller AJ, Ramalingam A, Chang MY (2009) BAR the door: Cancer suppression by amphiphysin-like genes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1795:25–36. doi: 10.1016/j.bbcan.2008.09.001
364. Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J (2006) Synapse Formation and Function Is Modulated by the Amyloid Precursor Protein. *The Journal of Neuroscience* 26:7212–7221. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1450-06.2006
365. Prokic I, Cowling BS, Laporte J (2014) Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med* 92:453–463. doi: 10.1007/s00109-014-1138-1
366. Pyndiah S, Tanida S, Ahmed KM, Cassimere EK, Choe C, Sakamuro D (2011) c-MYC Suppresses BIN1 to Release Poly(ADP-Ribose) Polymerase 1: A Mechanism by Which Cancer Cells Acquire Cisplatin Resistance. *Sci Signal* 4. doi: 10.1126/scisignal.2001556

367. Querfurth HW, LaFerla FM (2010) Alzheimer's Disease. *New England Journal of Medicine* 362:329–344. doi: 10.1056/NEJMra0909142
368. Rajan A, Perrimon N (2013) Of flies and men: insights on organismal metabolism from fruit flies. *BMC Biol* 11:38. doi: 10.1186/1741-7007-11-38
369. Rajendran L, Annaert W (2012) Membrane Trafficking Pathways in Alzheimer's Disease. *Traffic* 13:759–770. doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01332.x
370. Ramjaun AR, McPherson PS (1998) Multiple Amphiphysin II Splice Variants Display Differential Clathrin Binding : Identification of Two Distinct
371. Ramjaun AR, Micheva KD, Bouchelet I, McPherson PS (1997) Identification and Characterization of a Nerve Terminal-enriched Amphiphysin Isoform. *Journal of Biological Chemistry* 272:16700–16706. doi: 10.1074/jbc.272.26.16700
372. Ramjaun AR, Philie J, De Heuvel E, McPherson PS (1999) The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *Journal of Biological Chemistry* 274:19785–19791. doi: 10.1074/jbc.274.28.19785
373. Rand MD (2010) *Drosophotoxicology: The growing potential for Drosophila in neurotoxicology.* *Neurotoxicol Teratol* 32:74–83. doi: 10.1016/j.ntt.2009.06.004
374. Razzaq A, Robinson IM, McMahon HT, Skepper JN, Su Y, Zelfhof AC, Jackson AP, Gay NJ, O'Kane CJ (2001) Amphiphysin is necessary for organization of the excitation–contraction coupling machinery of muscles, but not for synaptic vesicle endocytosis in *Drosophila*. *Genes Dev* 15:2967–2979. doi: 10.1101/gad.207801
375. Reddy PH, Mani G, Park BS, Jacques J, Murdoch G, Whetsell W, Kaye J, Manczak M (2005) Differential loss of synaptic proteins in Alzheimer's disease: Implications for synaptic dysfunction. *Journal of Alzheimer's Disease* 7:103–117. doi: 10.3233/JAD-2005-7203
376. Reinhard C, Hébert SS, De Strooper B (2005) The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* 24:3996–4006. doi: 10.1038/sj.emboj.7600860
377. Reiter LT, Potocki L, Chien S, Gribskov M, Bier E (2001) A Systematic Analysis of Human Disease-Associated Gene Sequences In *Drosophila melanogaster*. *Genome Res* 11:1114–1125. doi: 10.1101/gr.169101
378. Reitz C (2017) Retromer Dysfunction and Neurodegenerative Disease. *Curr Genomics* 19:279–288. doi: 10.2174/1389202919666171024122809
379. Resende R, Ferreiro E, Pereira C, Resende de Oliveira C (2008) Neurotoxic effect of oligomeric and fibrillar species of amyloid-beta peptide 1-42: Involvement of endoplasmic reticulum calcium release in oligomer-induced cell death. *Neuroscience* 155:725–737. doi: 10.1016/j.neuroscience.2008.06.036
380. Reynolds CH, Garwood CJ, Wray S, Price C, Kellie S, Perera T, Zvelebil M, Yang A, Sheppard PW, Varndell IM, Hanger DP, Anderton BH (2008) Phosphorylation Regulates Tau Interactions with Src Homology 3 Domains of Phosphatidylinositol 3-Kinase, Phospholipase Cy1, Grb2, and Src Family Kinases. *Journal of Biological Chemistry* 283:18177–18186. doi: 10.1074/jbc.M709715200
381. Ringstad N, Nemoto Y, De Camilli P (1997) The SH3p4/Sh3p8/SH3p13 protein family: Binding partners for synaptojanin and dynamin via a Grb2-like Src homology 3 domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94:8569–8574. doi: 10.1073/pnas.94.16.8569
382. Rodal AA, Blunk AD, Akbergenova Y, Jorquera RA, Buhl LK, Littleton JT (2011) A presynaptic endosomal trafficking pathway controls synaptic growth signaling. *Journal of Cell Biology* 193:201–217. doi: 10.1083/jcb.201009052
383. Roe CM, Fagan AM, Grant EA, Hassenstab J, Moulder KL, Maue Dreyfus D, Sutphen CL, Benzinger TLS, Mintun MA, Holtzman DM, Morris JC (2013) Amyloid imaging and CSF biomarkers in predicting cognitive impairment up to 7.5 years later. *Neurology* 80:1784–1791. doi: 10.1212/WNL.0b013e3182918ca6
384. Rogava E, Meng Y, Lee JH, Gu Y, Kawarai T, Zou F, Katayama T, Baldwin CT, Cheng R, Hasegawa H, Chen F, Shibata N, Lunetta KL, Pardossi-Piquard R, Bohm C, Wakutani Y, Cupples LA, Cuenco KT, Green RC, Pinessi L, Rainero I, Sorbi S, Bruni A, Duara R, Friedland RP, Inzelberg R, Hampe W, Bujo H, Song Y-Q,



- Andersen OM, Willnow TE, Graff-Radford N, Petersen RC, Dickson D, Der SD, Fraser PE, Schmitt-Ulms G, Younkin S, Mayeux R, Farrer LA, St George-Hyslop P (2007) The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat Genet* 39:168–177. doi: 10.1038/ng1943
385. Rohe M, Hartl D, Fjorback AN, Klose J, Willnow TE (2013) SORLA-Mediated Trafficking of TrkB Enhances the Response of Neurons to BDNF. *PLoS One* 8:e72164. doi: 10.1371/journal.pone.0072164
386. Roher A, Gray EG, Paula-Barbosa M (1988) Alzheimer's disease: coated vesicles, coated pits and the amyloid-related cell. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 232:367–73. doi: 10.1098/rspb.1988.0001
387. De Rossi P, Andrew RJ, Musial TF, Buggia-Prevot V, Xu G, Ponnusamy M, Ly H, Krause S V., Rice RC, de l'Estoile V, Valin T, Salem S, Despa F, Borchelt DR, Bindokas VP, Nicholson D a., Thinakaran G (2018) Aberrant accrual of BIN1 near Alzheimer's disease amyloid deposits in transgenic models. *Brain Pathology* 1–17. doi: 10.1111/bpa.12687
388. De Rossi P, Buggia-Prevot V, Andrew R, Krause S, Woo E, Nelson P, Pytel P, Thinakaran G (2017) BIN1 localization is distinct from Tau tangles in Alzheimer's disease. *Matters (Zur)*. doi: 10.19185/matters.201611000018
389. De Rossi P, Buggia-Prévot V, Clayton BLL, Vasquez JB, Van Sanford C, Andrew RJ, Lesnick R, Botté A, Deyts C, Salem S, Rao E, Rice RC, Parent A, Kar S, Popko B, Pytel P, Estus S, Thinakaran G (2016) Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts. *Mol Neurodegener* 11. doi: 10.1186/s13024-016-0124-1
390. De Rossi P, Nomura T, Andrew RJ, Masse NY, Sampathkumar V, Musial TF, Sudwarts A, Recupero AJ, Le Metayer T, Hansen MT, Shim HN, Krause S V., Freedman DJ, Bindokas VP, Kasthuri N, Nicholson DA, Contractor A, Thinakaran G (2020) Neuronal BIN1 Regulates Presynaptic Neurotransmitter Release and Memory Consolidation. *Cell Rep* 30:3520-3535.e7. doi: 10.1016/j.celrep.2020.02.026
391. Routhier EL, Donover PS, Prendergast GC (2003) hob1+, the fission yeast homolog of Bin1, is dispensable for endocytosis or actin organization, but required for the response to starvation or genotoxic stress. *Oncogene* 22:637–648. doi: 10.1038/sj.onc.1206162
392. Rowe CC, Bourgeat P, Ellis KA, Brown B, Lim YY, Mulligan R, Jones G, Maruff P, Woodward M, Price R, Robins P, Tochon-Danguy H, O'Keefe G, Pike KE, Yates P, Szoeki C, Salvado O, Macaulay SL, O'Meara T, Head R, Cobiac L, Savage G, Martins R, Masters CL, Ames D, Villemagne VL (2013) Predicting Alzheimer disease with  $\beta$ -amyloid imaging: Results from the Australian imaging, biomarkers, and lifestyle study of ageing. *Ann Neurol* 74:905–913. doi: 10.1002/ana.24040
393. Royer B, Hnia K, Gavriilidis C, Tronchère H, Tosch V, Laporte J (2013) The myotubularin–amphiphysin 2 complex in membrane tubulation and centronuclear myopathies. *EMBO Rep* 14:907–915. doi: 10.1038/embor.2013.119
394. Rushton E, Rohrbough J, Broadie K (2009) Presynaptic secretion of mind-the-gap organizes the synaptic extracellular matrix-integrin interface and postsynaptic environments. *Developmental Dynamics* 238:554–571. doi: 10.1002/dvdy.21864
395. Saburova EA, Vasiliev AN, Kravtsova V V., Ryabova E V., Zefirov AL, Bolshakova OI, Sarantseva S V., Krivoi II (2017) Human APP Gene Expression Alters Active Zone Distribution and Spontaneous Neurotransmitter Release at the *Drosophila* Larval Neuromuscular Junction. *Neural Plast* 2017:1–10. doi: 10.1155/2017/9202584
396. Saha O, Melo de Farias AR, Pelletier A, Siedlecki-Wullich D, Gadaut J, Soares Landeira B, Carrier A, Vreulx A, Guyot K, Bonnefond A, Amouyel P, Marcos Queiroz C, Kilinc D, Delahaye F, Lambert J-C, R. Costa M (2022) Alzheimer's disease risk gene BIN1 modulates neural network activity through the regulation of L-type calcium channel expression in human induced neurons. *bioRxiv*. doi: <https://doi.org/10.1101/2022.01.18.476601>
397. Sakae N, Liu C-C, Shinohara M, Frisch-Daiello J, Ma L, Yamazaki Y, Tachibana M, Younkin L, Kurti A, Carrasquillo MM, Zou F, Sevlever D, Bisceglia G, Gan M, Fol R, Knight P, Wang M, Han X, Fryer JD, Fitzgerald ML, Ohyagi Y, Younkin SG, Bu G, Kanekiyo T (2016) ABCA7 Deficiency Accelerates Amyloid- $\beta$

- Generation and Alzheimer's Neuronal Pathology. *The Journal of Neuroscience* 36:3848–3859. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3757-15.2016
398. Sakamuro D, Elliott KJ, Wechsler-Reya R, Prendergast GC (1996) BIN1 is a novel MYC-interacting protein with features of a tumour suppressor. *Nat Genet* 14:69–77. doi: 10.1038/ng0996-69
399. Sakamuro D, Prendergast GC (1999) New Myc-interacting proteins: a second Myc network emerges. *Oncogene* 18:2942–2954. doi: 10.1038/sj.onc.1202725
400. Sartori M, Mendes T, Desai S, Lasorsa A, Herledan A, Malmanche N, Mäkinen P, Marttinen M, Malki I, Chapuis J, Flaig A, Vreulx AC, Ciancia M, Amouyel P, Leroux F, Déprez B, Cantrelle FX, Maréchal D, Pradier L, Hiltunen M, Landrieu I, Kilinc D, Herault Y, Laporte J, Lambert JC (2019) BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr 348 phosphorylation. *Acta Neuropathol*. doi: 10.1007/s00401-019-02017-9
401. Sassone J, Reale C, Dati G, Regoni M, Pellecchia MT, Garavaglia B (2021) The Role of VPS35 in the Pathobiology of Parkinson's Disease. *Cell Mol Neurobiol* 41:199–227. doi: 10.1007/s10571-020-00849-8
402. Satoh K, Abe-Dohmae S, Yokoyama S, St George-Hyslop P, Fraser PE (2015) ATP-binding Cassette Transporter A7 (ABCA7) Loss of Function Alters Alzheimer Amyloid Processing. *Journal of Biological Chemistry* 290:24152–24165. doi: 10.1074/jbc.M115.655076
403. Schmid SL (1997) CLATHRIN-COATED VESICLE FORMATION AND PROTEIN SORTING: An Integrated Process. *Annu Rev Biochem* 66:511–548. doi: 10.1146/annurev.biochem.66.1.511
404. Schürmann B, Bermingham DP, Kopeikina KJ, Myczek K, Yoon S, Horan KE, Kelly CJ, Martin-de-Saavedra MD, Forrest MP, Fawcett-Patel JM, Smith KR, Gao R, Bach A, Burette AC, Rappoport JZ, Weinberg RJ, Martina M, Penzes P (2019) A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Mol Psychiatry*. doi: 10.1038/s41380-019-0407-3
405. Schuster CM (2006) Glutamatergic synapses of *Drosophila* neuromuscular junctions: a high-resolution model for the analysis of experience-dependent potentiation. *Cell Tissue Res* 326:287–299. doi: 10.1007/s00441-006-0290-5
406. Scott K, Becker A, Sun Y, Hardy R, Zuker C (1995) Gq $\alpha$  protein function in vivo: Genetic dissection of its role in photoreceptor cell physiology. *Neuron* 15:919–927. doi: 10.1016/0896-6273(95)90182-5
407. Seaman MNJ (2012) The retromer complex – endosomal protein recycling and beyond. *J Cell Sci*. doi: 10.1242/jcs.103440
408. Seeger RC, Brodeur GM, Sather H, Dalton A, Siegel SE, Wong KY, Hammond D (1985) Association of Multiple Copies of the N- *myc* Oncogene with Rapid Progression of Neuroblastomas. *New England Journal of Medicine* 313:1111–1116. doi: 10.1056/NEJM198510313131802
409. Selkoe DJ, Hardy J (2016) The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO Mol Med* 8:595–608. doi: 10.15252/emmm.201606210
410. Sengupta S, Barber TR, Xia H, Ready DF, Hardie RC (2013) Depletion of PtdIns(4,5)P<sub>2</sub> underlies retinal degeneration in *Drosophila* *trp* mutants. *J Cell Sci* 126:1247–1259. doi: 10.1242/jcs.120592
411. Seshadri S (2010) Genome-wide Analysis of Genetic Loci Associated With Alzheimer Disease. *JAMA* 303:1832. doi: 10.1001/jama.2010.574
412. Sharma C, Kim S, Nam Y, Jung UJ, Kim SR (2021) Mitochondrial Dysfunction as a Driver of Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci* 22. doi: 10.3390/ijms22094850
413. Shen R, Zhao X, He L, Ding Y, Xu W, Lin S, Fang S, Yang W, Sung K, Spencer B, Rissman RA, Lei M, Ding J, Wu C (2020) Upregulation of RIN3 induces endosomal dysfunction in Alzheimer's disease. *Transl Neurodegener* 9:1–19. doi: 10.1186/s40035-020-00206-1
414. Sheng Z-H, Cai Q (2012) Mitochondrial transport in neurons: impact on synaptic homeostasis and neurodegeneration. *Nat Rev Neurosci* 13:77–93. doi: 10.1038/nrn3156
415. Shi W, Chen Y, Gan G, Wang D, Ren J, Wang Q, Xu Z, Xie W, Zhang YQ (2013) Brain Tumor Regulates Neuromuscular Synapse Growth and Endocytosis in *Drosophila* by Suppressing Mad Expression. *Journal of Neuroscience* 33:12352–12363. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0386-13.2013

416. Shi Y, Yamada K, Liddelaw SA, Smith ST, Zhao L, Luo W, Tsai RM, Spina S, Grinberg LT, Rojas JC, Gallardo G, Wang K, Roh J, Robinson G, Finn MB, Jiang H, Sullivan PM, Baufeld C, Wood MW, Sutphen C, McCue L, Xiong C, Del-Aguila JL, Morris JC, Cruchaga C, Fagan AM, Miller BL, Boxer AL, Seeley WW, Butovsky O, Barres BA, Paul SM, Holtzman DM (2017) ApoE4 markedly exacerbates tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of tauopathy. *Nature* 549:523–527. doi: 10.1038/nature24016
417. Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D, Chipendo P, Chibnik LB, Diamond A, Perrimon N, Brown NH, De Jager PL, Feany MB (2014) Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet* 23:870–877. doi: 10.1093/hmg/ddt478
418. Shupliakov O, Löw P, Grabs D, Gad H, Chen H, David C, Takei K, De Camilli P, Brodin L (1997) Synaptic Vesicle Endocytosis Impaired by Disruption of Dynamin-SH3 Domain Interactions. *Science* (1979) 276:259–263. doi: 10.1126/science.276.5310.259
419. Siedlecki-Wullich D, Miñano-Molina AJ, Rodríguez-Álvarez J (2021) microRNAs as Early Biomarkers of Alzheimer's Disease: A Synaptic Perspective. *Cells* 10:113. doi: 10.3390/cells10010113
420. Sierksma A, Lu A, Mancuso R, Fattorelli N, Thrupp N, Salta E, Zoco J, Blum D, Buée L, De Strooper B, Fiers M (2020) Novel Alzheimer risk genes determine the microglia response to amyloid- $\beta$  but not to TAU pathology. *EMBO Mol Med* 12. doi: 10.15252/emmm.201910606
421. Sims R, Van Der Lee SJ, Naj AC, Bellenguez C, Badarinarayan N, Jakobsdottir J, Kunkle BW, Boland A, Raybould R, Bis JC, Martin ER, Grenier-Boley B, Heilmann-Heimbach S, Chouraki V, Kuzma AB, Sleegers K, Vronskaya M, Ruiz A, Graham RR, Olaso R, Hoffmann P, Grove ML, Vardarajan BN, Hiltunen M, Nöthen MM, White CC, Hamilton-Nelson KL, Epelbaum J, Maier W, Choi SH, Beecham GW, Dulary C, Herms S, Smith A V., Funk CC, Derbois C, Forstner AJ, Ahmad S, Li H, Bacq D, Harold D, Satizabal CL, Valladares O, Squassina A, Thomas R, Brody JA, Qu L, Sánchez-Juan P, Morgan T, Wolters FJ, Zhao Y, Garcia FS, Denning N, Fornage M, Malamon J, Naranjo MCD, Majounie E, Mosley TH, Dombroski B, Wallon D, Lupton MK, Dupuis J, Whitehead P, Fratiglioni L, Medway C, Jian X, Mukherjee S, Keller L, Brown K, Lin H, Cantwell LB, Panza F, McGuinness B, Moreno-Grau S, Burgess JD, Solfrizzi V, Proitsi P, Adams HH, Allen M, Seripa D, Pastor P, Cupples LA, Price ND, Hannequin D, Frank-García A, Levy D, Chakrabarty P, Caffarra P, Giegling I, Beiser AS, Giedraitis V, Hampel H, Garcia ME, Wang X, Lannfelt L, Mecocci P, Eiriksdottir G, Crane PK, Pasquier F, Boccardi V, Henández I, Barber RC, Scherer M, Tarraga L, Adams PM, Leber M, Chen Y, Albert MS, Riedel-Heller S, Emilsson V, Beekly D, Braae A, Schmidt R, Blacker D, Masullo C, Schmidt H, Doody RS, Spalletta G, Jr WTL, Fairchild TJ, Bossù P, Lopez OL, Frosch MP, Sacchinelli E, Ghetti B, Yang Q, Huebinger RM, Jessen F, Li S, Kamboh MI, Morris JC, Sotolongo-Grau O, Katz MJ, Corcoran C, Dunstan M, Braddel A, Thomas C, Meggy A, Marshall R, Gerrish A, Chapman J, Aguilar M, Taylor S, Hill M, Fairén MD, Hodges A, Vellas B, Soininen H, Kloszewska I, Daniilidou M, Uphill J, Patel Y, Hughes JT, Lord J, Turton J, Hartmann AM, Cecchetti R, Fenoglio C, Serpente M, Arcaro M, Caltagirone C, Orfei MD, Ciaramella A, Pichler S, Mayhaus M, Gu W, Lleó A, Fortea J, Blesa R, Barber IS, Brookes K, Cupidi C, Maletta RG, Carrell D, Sorbi S, Moebus S, Urbano M, Pilotto A, Kornhuber J, Bosco P, Todd S, Craig D, Johnston J, Gill M, Lawlor B, Lynch A, Fox NC, Hardy J, Albin RL, Apostolova LG, Arnold SE, Asthana S, Atwood CS, Baldwin CT, Barnes LL, Barral S, Beach TG, Becker JT, Bigio EH, Bird TD, Boeve BF, Bowen JD, Boxer A, Burke JR, Burns JM, Buxbaum JD, Cairns NJ, Cao C, Carlson CS, Carlsson CM, Carney RM, Carrasquillo MM, Carroll SL, Diaz CC, Chui HC, Clark DG, Cribbs DH, Crocco EA, Decarli C, Dick M, Duara R, Evans DA, Faber KM, Fallon KB, Fardo DW, Farlow MR, Ferris S, Foroud TM, Galasko DR, Gearing M, Geschwind DH, Gilbert JR, Graff-Radford NR, Green RC, Growdon JH, Hamilton RL, Harrell LE, Honig LS, Huentelman MJ, Hulette CM, Hyman BT, Jarvik GP, Abner E, Jin LW, Jun G, Karydas A, Kaye JA, Kim R, Kowall NW, Kramer JH, Laferla FM, Lah JJ, Leverenz JB, Levey AI, Li G, Lieberman AP, Lunetta KL, Lyketsos CG, Marson DC, Martiniuk F, Mash DC, Masliah E, McCormick WC, McCurry SM, McDavid AN, McKee AC, Mesulam M, Miller BL, Miller CA, Miller JW, Murrell JR, Myers AJ, O'Bryant S, Olichney JM, Pankratz VS, Parisi JE, Paulson HL, Perry W, Peskind E, Pierce A, Poon WW, Potter H, Quinn JF, Raj A, Raskind M, Reisberg B, Reitz C, Ringman JM, Roberson ED, Rogaeva E, Rosen HJ, Rosenberg RN, Sager MA, Saykin AJ, Schneider JA, Schneider LS,

- Seeley WW, Smith AG, Sonnen JA, Spina S, Stern RA, Swerdlow RH, Tanzi RE, Thornton-Wells TA, Trojanowski JQ, Troncoso JC, Van Deerlin VM, Van Eldik LJ, Vinters H V., Vonsattel JP, Weintraub S, Welsh-Bohmer KA, Wilhelmsen KC, Williamson J, Wingo TS, Woltjer RL, Wright CB, Yu CE, Yu L, Garzia F, Golamaully F, Septier G, Engelborghs S, Vandenberghe R, De Deyn PP, Fernandez CM, Benito YA, Thonberg H, Forsell C, Lilius L, Kinhult-Ståhlbom A, Kilander L, Brundin R, Concari L, Helisalmi S, Koivisto AM, Haapasalo A, Dermecourt V, Fievet N, Hanon O, Dufouil C, Brice A, Ritchie K, Dubois B, Himali JJ, Keene CD, Tschanz J, Fitzpatrick AL, Kukull WA, Norton M, Aspelund T, Larson EB, Munger R, Rotter JI, Lipton RB, Bullido MJ, Hofman A, Montine TJ, Coto E, Boerwinkle E, Petersen RC, Alvarez V, Rivadeneira F, Reiman EM, Gallo M, O'Donnell CJ, Reisch JS, Bruni AC, Royall DR, Dichgans M, Sano M, Galimberti D, St George-Hyslop P, Scarpini E, Tsuang DW, Mancuso M, Bonuccelli U, Winslow AR, Daniele A, Wu CK, Peters O, Nacmias B, Riemenschneider M, Heun R, Brayne C, Rubinsztein DC, Bras J, Guerreiro R, Al-Chalabi A, Shaw CE, Collinge J, Tsolaki M, Clarimón J, Sussams R, Lovestone S, O'Donovan MC, Owen MJ, Behrens TW, Mead S, Uitterlinden AG, Holmes C, Cruchaga C, Ingelsson M, Bennett DA, Powell J, Golde TE, Graff C, De Jager PL, Morgan K, Ertekin-Taner N, Combarros O, Psaty BM, Passmore P, Younkin SG, Berr C, Gudnason V, Rujescu D, Dickson DW, Dartigues JF, Destefano AL, Ortega-Cubero S, Hakonarson H, Champion D, Boada M, Kauwe JK, Farrer LA, Van Broeckhoven C, Ikram MA, Jones L, Haines JL, Tzourio C, Tzourio C, Escott-Price V, Mayeux R, Deleuze JF, Amin N, Goate AM, Pericak-Vance MA, Amouyel P, Van Duijn CM, Ramirez A, Wang LS, Lambert JC, Seshadri S, Williams J, Schellenberg GD (2017) Rare coding variants in PLCG2, ABI3, and TREM2 implicate microglial-mediated innate immunity in Alzheimer's disease. *Nat Genet* 49:1373–1384. doi: 10.1038/ng.3916
422. Slepnev VI, De Camilli P (2000) Accessory factors in clathrin-dependent synaptic vesicle endocytosis. *Nat Rev Neurosci* 1:161–172. doi: 10.1038/35044540
423. Slepnev VI, Ochoa G-C, Butler MH, Grabs D, Camilli P De (1998) Role of Phosphorylation in Regulation of the Assembly of Endocytic Coat Complexes. *Science* (1979) 281:821–824. doi: 10.1126/science.281.5378.821
424. Small SA, Simoes-Spassov S, Mayeux R, Petsko GA (2017) Endosomal Traffic Jams Represent a Pathogenic Hub and Therapeutic Target in Alzheimer's Disease. *Trends Neurosci* 40:592–602. doi: 10.1016/j.tins.2017.08.003
425. Song M, Zhao X, Song F (2021) Aging-Dependent Mitophagy Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 58:2362–2378. doi: 10.1007/s12035-020-02248-y
426. Sottejeau Y, Bretteville A, Cantrelle FX, Malmanche N, Demiaute F, Mendes T, Delay C, Alves Dos Alves H, Flaig A, Davies P, Dourlen P, Dermaut B, Laporte J, Amouyel P, Lippens G, Chapuis J, Landrieu I, Lambert JC (2015) Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain. *Acta Neuropathol Commun* 3:58. doi: 10.1186/s40478-015-0237-8
427. Spiegelhalter C, Tosch V, Hentsch D, Koch M, Kessler P, Schwab Y, Laporte J (2010) From Dynamic Live Cell Imaging to 3D Ultrastructure: Novel Integrated Methods for High Pressure Freezing and Correlative Light-Electron Microscopy. *PLoS One* 5:e9014. doi: 10.1371/journal.pone.0009014
428. Spillantini MG, Goedert M (2013) Tau pathology and neurodegeneration. *Lancet Neurol* 12:609–622. doi: 10.1016/S1474-4422(13)70090-5
429. Spires-Jones T, Knafo S (2012) Spines, Plasticity, and Cognition in Alzheimer's Model Mice. *Neural Plast* 2012:1–10. doi: 10.1155/2012/319836
430. Spires-Jones TL, Hyman BT (2014) The intersection of amyloid beta and tau at synapses in Alzheimer's disease
431. Streit WJ, Khoshbouei H, Bechmann I (2021) The Role of Microglia in Sporadic Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis* 79:961–968. doi: 10.3233/JAD-201248
432. Strittmatter WJ, Saunders AM, Schmechel D, Pericak-Vance M, Enghild J, Salvesen GS, Roses AD (1993) Apolipoprotein E: high-avidity binding to beta-amyloid and increased frequency of type 4 allele in late-onset familial Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:1977–1981. doi: 10.1073/pnas.90.5.1977

433. Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD (1993) Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:8098–8102. doi: 10.1073/pnas.90.17.8098
434. Sturtevant AH (1913) The linear arrangement of six sex-linked factors in *Drosophila*, as shown by their mode of association. *Journal of Experimental Zoology* 14:43–59. doi: 10.1002/jez.1400140104
435. Südhof TC (2012) The Presynaptic Active Zone. *Neuron* 75:11–25. doi: 10.1016/j.neuron.2012.06.012
436. Sweeney ST, Davis GW (2002) Unrestricted Synaptic Growth in spinster—a Late Endosomal Protein Implicated in TGF- $\beta$ -Mediated Synaptic Growth Regulation. *Neuron* 36:403–416. doi: 10.1016/S0896-6273(02)01014-0
437. Taga M, Petyuk V a, White C, Marsh G, Ma Y, Connor SM, Khairallah A, Olah M, Schneider J (2020) BIN1 protein isoforms are differentially expressed in astrocytes , neurons , and microglia : neuronal and astrocyte BIN1 implicated in Tau pathology
438. Tajiri T, Liu X, Thompson PM, Tanaka S, Suita S, Zhao H, Maris JM, Prendergast GC, Hogarty MD (2003) Expression of a MYCN-interacting isoform of the tumor suppressor BIN1 is reduced in neuroblastomas with unfavorable biological features. *Clin Cancer Res* 9:3345–55
439. Takami M, Nagashima Y, Sano Y, Ishihara S, Morishima-Kawashima M, Funamoto S, Ihara Y (2009)  $\gamma$ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of  $\beta$ -Carboxyl Terminal Fragment. *The Journal of Neuroscience* 29:13042–13052. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009
440. Takeda T, Kozai T, Yang H, Ishikuro D, Seyama K, Kumagai Y, Abe T, Yamada H, Uchihashi T, Ando T, Takei K (2018) Dynamic clustering of dynamin-amphiphysin helices regulates membrane constriction and fission coupled with GTP hydrolysis. *Elife* 7. doi: 10.7554/eLife.30246
441. Takei K, Slepnev VI, Haucke V, De Camilli P (1999) Functional partnership between amphiphysin and dynamin in clathrin-mediated endocytosis. *Nat Cell Biol* 1:33–39. doi: 10.1038/9004
442. Tan J, Evin G (2012)  $\beta$ -Site APP-cleaving enzyme 1 trafficking and Alzheimer’s disease pathogenesis. *J Neurochem* no-no. doi: 10.1111/j.1471-4159.2011.07623.x
443. Tan MS, Yu JT, Tan L (2013) Bridging integrator 1 (BIN1): Form, function, and Alzheimer’s disease. *Trends Mol Med* 19:594–603
444. Tao Q-Q, Chen Y-C, Wu Z-Y (2019) The role of CD2AP in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease. *Aging Dis* 10:901. doi: 10.14336/AD.2018.1025
445. Taylor MJ, Perrais D, Merrifield CJ (2011) A High Precision Survey of the Molecular Dynamics of Mammalian Clathrin-Mediated Endocytosis. *PLoS Biol* 9:e1000604. doi: 10.1371/journal.pbio.1000604
446. Tebar F, Bohlander SK, Sorkin A (1999) Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-coated Pits, Interactions with Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-mediated Traffic. *Mol Biol Cell* 10:2687–2702. doi: 10.1091/mbc.10.8.2687
447. Terwel D, Muyliaert D, Dewachter I, Borghgraef P, Croes S, Devijver H, Van Leuven F (2008) Amyloid Activates GSK-3 $\beta$  to Aggravate Neuronal Tauopathy in Bigenic Mice. *Am J Pathol* 172:786–798. doi: 10.2353/ajpath.2008.070904
448. Thinakaran G, Koo EH (2008) Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function. *Journal of Biological Chemistry* 283:29615–29619. doi: 10.1074/jbc.R800019200
449. Tjondrokoesoemo A, Park KH, Ferrante C, Komazaki S, Lesniak S, Brotto M, Ko J-K, Zhou J, Weisleder N, Ma J (2011) Disrupted Membrane Structure and Intracellular Ca<sup>2+</sup> Signaling in Adult Skeletal Muscle with Acute Knockdown of Bin1. *PLoS One* 6:e25740. doi: 10.1371/journal.pone.0025740
450. Tooze SA, Abada A, Elazar Z (2014) Endocytosis and Autophagy: Exploitation or Cooperation? *Cold Spring Harb Perspect Biol* 6:a018358–a018358. doi: 10.1101/cshperspect.a018358
451. Torroja L, Packard M, Gorczyca M, White K, Budnik V (1999) The *Drosophila*-Amyloid Precursor Protein Homolog Promotes Synapse Differentiation at the Neuromuscular Junction

452. Tortora F, Rendina A, Angiolillo A, Di Costanzo A, Aniello F, Donizetti A, Febbraio F, Vitale E (2022) CD33 rs2455069 SNP: Correlation with Alzheimer's Disease and Hypothesis of Functional Role. *Int J Mol Sci* 23. doi: 10.3390/ijms23073629
453. Toussaint A, Cowling BS, Hnia K, Mohr M, Oldfors A, Schwab Y, Yis U, Maisonobe T, Stojkovic T, Wallgren-Pettersson C, Laugel V, Echaniz-Laguna A, Mandel J-L, Nishino I, Laporte J (2011) Defects in amphiphysin 2 (BIN1) and triads in several forms of centronuclear myopathies. *Acta Neuropathol* 121:253–266. doi: 10.1007/s00401-010-0754-2
454. Trousdale C, Kim K (2015) Retromer: Structure, function, and roles in mammalian disease. *Eur J Cell Biol* 94:513–521. doi: 10.1016/j.ejcb.2015.07.002
455. Truman JW (1990) Metamorphosis of the central nervous system of *Drosophila*. *J Neurobiol* 21:1072–1084. doi: 10.1002/neu.480210711
456. Tsutsui K, Maeda Y, Tsutsui K, Seki S, Tokunaga A (1997) cDNA Cloning of a Novel Amphiphysin Isoform and Tissue-Specific Expression of Its Multiple Splice Variants. *Biochem Biophys Res Commun* 236:178–183. doi: 10.1006/bbrc.1997.6927
457. Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC (2003) Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70:1–32. doi: 10.1016/S0301-0082(03)00089-3
458. Ubelmann F, Burrenha T, Salavessa L, Gomes R, Ferreira C, Moreno N, Guimas Almeida C (2017) Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. *EMBO Rep* 18:102–122. doi: 10.15252/embr.201642738
459. Uchihara T (2014) Pretangles and neurofibrillary changes: Similarities and differences between AD and CBD based on molecular and morphological evolution. *Neuropathology* 34:571–577. doi: 10.1111/neup.12108
460. Udayar V, Buggia-Prévot V, Guerreiro RL, Siegel G, Rambabu N, Soohoo AL, Ponnusamy M, Siegenthaler B, Bali J, Simons M, Ries J, Puthenveedu MA, Hardy J, Thinakaran G, Rajendran L, Guerreiro R, Brás J, Sassi C, Gibbs JR, Hernandez D, Lupton MK, Brown K, Morgan K, Powell J, Singleton A, Hardy J (2013) A Paired RNAi and RabGAP Overexpression Screen Identifies Rab11 as a Regulator of  $\beta$ -Amyloid Production. *Cell Rep* 5:1536–1551. doi: 10.1016/j.celrep.2013.12.005
461. Ullah MF, Ahmad A, Bhat SH, Abu-Duhier FM, Barreto GE, Ashraf GM (2019) Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders. *Neurosci Biobehav Rev* 102:95–105. doi: 10.1016/j.neubiorev.2019.04.003
462. Van Vactor D, Sigrist SJ (2017) Presynaptic morphogenesis, active zone organization and structural plasticity in *Drosophila*. *Curr Opin Neurobiol* 43:119–129. doi: 10.1016/j.conb.2017.03.003
463. Vagnozzi AN, Li J-G, Chiu J, Razmpour R, Warfield R, Ramirez SH, Praticò D (2021) RETRACTED ARTICLE: VPS35 regulates tau phosphorylation and neuropathology in tauopathy. *Mol Psychiatry* 26:6992–7005. doi: 10.1038/s41380-019-0453-x
464. van der Kant R, Goldstein LSB (2015) Cellular Functions of the Amyloid Precursor Protein from Development to Dementia. *Dev Cell* 32:502–515. doi: 10.1016/j.devcel.2015.01.022
465. Vanlandingham PA, Barmchi MP, Royer S, Green R, Bao H, Reist N, Zhang B (2014) AP180 couples protein retrieval to clathrin-mediated endocytosis of synaptic vesicles. *Traffic* 15:433–450. doi: 10.1111/tra.12153
466. Vardarajan BN, Ghani M, Kahn A, Sheikh S, Sato C, Barral S, Lee JH, Cheng R, Reitz C, Lantigua R, Reyes-Dumeyer D, Medrano M, Jimenez-Velazquez IZ, Rogava E, St George-Hyslop P, Mayeux R (2015) Rare coding mutations identified by sequencing of  $\text{A}\beta$  Alzheimer disease genome-wide association studies loci. *Ann Neurol* 78:487–498. doi: 10.1002/ana.24466
467. Venken KJT, Bellen HJ (2005) Emerging technologies for gene manipulation in *Drosophila melanogaster*. *Nat Rev Genet* 6:167–178. doi: 10.1038/nrg1553

468. Veselkina ER, Trostnikov M V., Roshina N V., Pasyukova EG (2023) The Effect of the Tau Protein on *D. melanogaster* Lifespan Depends on GSK3 Expression and Sex. *Int J Mol Sci* 24:2166. doi: 10.3390/ijms24032166
469. Voskobiynek Y, Roth JR, Cochran JN, Rush T, Carullo NVN, Mesina JS, Waqas M, Vollmer RM, Day JJ, McMahon LL, Roberson ED (2020) Alzheimer's disease risk gene BIN1 induces Tau-dependent network hyperexcitability. *Elife* 9:1–25. doi: 10.7554/eLife.57354
470. Wang H-F, Wan Y, Hao X-K, Cao L, Zhu X-C, Jiang T, Tan M-S, Tan L, Zhang D-Q, Tan L, Yu J-T (2016) Bridging Integrator 1 (BIN1) Genotypes Mediate Alzheimer's Disease Risk by Altering Neuronal Degeneration. *Journal of Alzheimer's Disease* 52:179–190. doi: 10.3233/JAD-150972
471. Wang S, Tan KL, Agosto MA, Xiong B, Yamamoto S, Sandoval H, Jaiswal M, Bayat V, Zhang K, Charng W-L, David G, Duraine L, Venkatachalam K, Wensel TG, Bellen HJ (2014) The Retromer Complex Is Required for Rhodopsin Recycling and Its Loss Leads to Photoreceptor Degeneration. *PLoS Biol* 12:e1001847. doi: 10.1371/journal.pbio.1001847
472. Wang T, Montell C (2007) Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch* 454:821–847. doi: 10.1007/s00424-007-0251-1
473. Wang Y, Balaji V, Kaniyappan S, Krüger L, Irsen S, Tepper K, Chandupatla R, Maetzler W, Schneider A, Mandelkow E, Mandelkow E-M (2017) The release and trans-synaptic transmission of Tau via exosomes. *Mol Neurodegener* 12:5. doi: 10.1186/s13024-016-0143-y
474. Wang Y, Mandelkow E (2016) Tau in physiology and pathology. *Nat Rev Neurosci* 17:22–35. doi: 10.1038/nrn.2015.1
475. Wangler MF, Yamamoto S, Bellen HJ (2015) Fruit Flies in Biomedical Research. *Genetics* 199:639–653. doi: 10.1534/genetics.114.171785
476. Watson MR, Lagow RD, Xu K, Zhang B, Bonini NM (2008) A *Drosophila* Model for Amyotrophic Lateral Sclerosis Reveals Motor Neuron Damage by Human SOD1. *Journal of Biological Chemistry* 283:24972–24981. doi: 10.1074/jbc.M804817200
477. Wechsler-Reya R, Sakamuro D, Zhang J, Duhadaway J, Prendergast GC (1997) Structural Analysis of the Human BIN1 Gene. *Journal of Biological Chemistry* 272:31453–31458. doi: 10.1074/jbc.272.50.31453
478. Wechsler-Reya RJ, Elliott KJ, Prendergast GC (1998) A Role for the Putative Tumor Suppressor Bin1 in Muscle Cell Differentiation. *Mol Cell Biol* 18:566–575. doi: 10.1128/MCB.18.1.566
479. Weigmann K, Klapper R, Strasser T, Rickert C, Technau G, Jäckle H, Janning W, Klämbt C (2003) FlyMove – a new way to look at development of *Drosophila*. *Trends in Genetics* 19:310–311. doi: 10.1016/S0168-9525(03)00050-7
480. Weller J, Budson A (2018) Current understanding of Alzheimer's disease diagnosis and treatment. *F1000Res* 7. doi: 10.12688/f1000research.14506.1
481. Wigge P, McMahon HT (1998) The amphiphysin family of proteins and their role in endocytosis at the synapse. *Trends Neurosci* 21:339–344. doi: 10.1016/S0166-2236(98)01264-8
482. Wijsman EM, Pankratz ND, Choi Y, Rothstein JH, Faber KM, Cheng R, Lee JH, Bird TD, Bennett DA, Diaz-Arrastia R, Goate AM, Farlow M, Ghetti B, Sweet RA, Foroud TM, Mayeux R (2011) Genome-Wide Association of Familial Late-Onset Alzheimer's Disease Replicates BIN1 and CLU and Nominates CUGBP2 in Interaction with APOE. *PLoS Genet* 7:e1001308. doi: 10.1371/journal.pgen.1001308
483. Williams DW, Truman JW (2005) Cellular mechanisms of dendrite pruning in *Drosophila*: insights from in vivo time-lapse of remodeling dendritic arborizing sensory neurons. *Development* 132:3631–3642. doi: 10.1242/dev.01928
484. Winblad B, Amouyel P, Andrieu S, Ballard C, Brayne C, Brodaty H, Cedazo-Minguez A, Dubois B, Edvardsson D, Feldman H, Fratiglioni L, Frisoni GB, Gauthier S, Georges J, Graff C, Iqbal K, Jessen F, Johansson G, Jönsson L, Kivipelto M, Knapp M, Mangialasche F, Melis R, Nordberg A, Rikkert MO, Qiu C, Sakmar TP, Scheltens P, Schneider LS, Sperling R, Tjernberg LO, Waldemar G, Wimo A, Zetterberg H (2016) Defeating Alzheimer's disease and other dementias: a priority for European science and society. *Lancet Neurol* 15:455–532. doi: 10.1016/S1474-4422(16)00062-4

485. Winckler B, Faundez V, Maday S, Cai Q, Guimas Almeida C, Zhang H (2018) The Endolysosomal System and Proteostasis: From Development to Degeneration. *The Journal of Neuroscience* 38:9364–9374. doi: 10.1523/JNEUROSCI.1665-18.2018
486. Wolfe MS (2019) Dysfunctional  $\gamma$ -Secretase in Familial Alzheimer's Disease. *Neurochem Res* 44:5–11. doi: 10.1007/s11064-018-2511-1
487. Wood JG, Mirra SS, Pollock NJ, Binder LI (1986) Neurofibrillary tangles of Alzheimer disease share antigenic determinants with the axonal microtubule-associated protein tau ( $\tau$ ). *Proceedings of the National Academy of Sciences* 83:4040–4043. doi: 10.1073/pnas.83.11.4040
488. Woodruff G, Reyna SM, Dunlap M, Van Der Kant R, Callender JA, Young JE, Roberts EA, Goldstein LSB (2016) Defective Transcytosis of APP and Lipoproteins in Human iPSC-Derived Neurons with Familial Alzheimer's Disease Mutations. *Cell Rep* 17:759–773. doi: 10.1016/j.celrep.2016.09.034
489. Wu J, Petralia RS, Kurushima H, Patel H, Jung M, Volk L, Chowdhury S, Shepherd JD, Dehoff M, Li Y, Kuhl D, Haganir RL, Price DL, Scannevin R, Troncoso JC, Wong PC, Worley PF (2011) Arc/Arg3.1 Regulates an Endosomal Pathway Essential for Activity-Dependent  $\beta$ -Amyloid Generation. *Cell* 147:615–628. doi: 10.1016/j.cell.2011.09.036
490. Xiao Q, Gil S-C, Yan P, Wang Y, Han S, Gonzales E, Perez R, Cirrito JR, Lee J-M (2012) Role of Phosphatidylinositol Clathrin Assembly Lymphoid-Myeloid Leukemia (PICALM) in Intracellular Amyloid Precursor Protein (APP) Processing and Amyloid Plaque Pathogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 287:21279–21289. doi: 10.1074/jbc.M111.338376
491. Xu B, Fu Y, Liu Y, Agvanian S, Wirka RC, Baum R, Zhou K, Shaw RM, Hong TT (2017) The ESCRT-III pathway facilitates cardiomyocyte release of cBIN1-containing microparticles. *PLoS Biol* 15. doi: 10.1371/journal.pbio.2002354
492. Xu W, Kong W, Gao Z, Huang E, Xie W, Wang S, Rui M (2023) Establishment of a novel axon pruning model of *Drosophila* motor neuron. *Biol Open* 12. doi: 10.1242/bio.059535
493. Xu W, Tan L, Yu JT (2015) The Role of PICALM in Alzheimer's Disease. *Mol Neurobiol* 52:399–413. doi: 10.1007/s12035-014-8878-3
494. Yamada H, Ohashi E, Abe T, Kusumi N, Li S-A, Yoshida Y, Watanabe M, Tomizawa K, Kashiwakura Y, Kumon H, Matsui H, Takei K (2007) Amphiphysin 1 Is Important for Actin Polymerization during Phagocytosis. *Mol Biol Cell* 18:4669–4680. doi: 10.1091/mbc.e07-04-0296
495. Yamazaki H, Bujo H, Kusunoki J, Seimiya K, Kanaki T, Morisaki N, Schneider WJ, Saito Y (1996) Elements of Neural Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor Are Present in a Novel Mammalian Low Density Lipoprotein Receptor Family Member. *Journal of Biological Chemistry* 271:24761–24768. doi: 10.1074/jbc.271.40.24761
496. Yeh FL, Wang Y, Tom I, Gonzalez LC, Sheng M (2016) TREM2 Binds to Apolipoproteins, Including APOE and CLU/APOJ, and Thereby Facilitates Uptake of Amyloid-Beta by Microglia. *Neuron* 91:328–340. doi: 10.1016/j.neuron.2016.06.015
497. Young AMH, Kumasaka N, Calvert F, Hammond TR, Panousis N, Schwartzenruber J, Liu J, Kundu K, Garnett MR, Fernandes H, Timofeev I, Jalloh I, Mannion R, Mair R, Watts C, Price SJ, Peter J (2019) A map of transcriptional heterogeneity and regulatory variation in human microglia
498. Young JE, Boulanger-Weill J, Williams DA, Woodruff G, Buen F, Revilla AC, Herrera C, Israel MA, Yuan SH, Edland SD, Goldstein LSB (2015) Elucidating Molecular Phenotypes Caused by the SORL1 Alzheimer's Disease Genetic Risk Factor Using Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell* 16:373–385. doi: 10.1016/j.stem.2015.02.004
499. Yu C, Nwabuisi-Heath E, Laxton K, LaDu MJ (2010) Endocytic pathways mediating oligomeric A $\beta$ 42 neurotoxicity. *Mol Neurodegener* 5:19. doi: 10.1186/1750-1326-5-19
500. Yu H, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW, Schrelber SL (1994) Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell* 76:933–945. doi: 10.1016/0092-8674(94)90367-0
501. Yu L, Chibnik LB, Srivastava GP, Pochet N, Yang J, Xu J, Kozubek J, Obholzer N, Leurgans SE, Schneider JA, Meissner A, De Jager PL, Bennett DA (2015) Association of Brain DNA Methylation in *SORL1*, *ABCA7*,



- HLA-DRB5*, *SLC24A4*, and *BIN1* With Pathological Diagnosis of Alzheimer Disease. *JAMA Neurol* 72:15. doi: 10.1001/jamaneurol.2014.3049
502. Yu Y, Niccoli T, Ren Z, Woodling NS, Aleyakpo B, Szabadkai G, Partridge L (2020) PICALM rescues glutamatergic neurotransmission, behavioural function and survival in a *Drosophila* model of A $\beta$ 42 toxicity. *Hum Mol Genet* 29:2420–2434. doi: 10.1093/hmg/ddaa125
503. Zaabi M, Smaoui N, Hariri W, Derbel H (2022) Deep and Statistical-Based Methods for Alzheimer's Disease Detection: A Survey. *Journal of Computing Science and Engineering* 16:1–13. doi: 10.5626/JCSE.2022.16.1.1
504. Zelhof AC, Bao H, Hardy RW, Razzaq A, Zhang B, Doe CQ (2001) *Drosophila* Amphiphysin is implicated in protein localization and membrane morphogenesis but not in synaptic vesicle endocytosis. *Development* 128:5005–15
505. Zhang B, Koh YH, Beckstead RB, Budnik V, Ganetzky B, Bellen HJ (1998) Synaptic vesicle size and number are regulated by a clathrin adaptor protein required for endocytosis. *Neuron* 21:1465–1475. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80664-9
506. Zhang J, Schulze KL, Hiesinger PR, Suyama K, Wang S, Fish M, Acar M, Hoskins RA, Bellen HJ, Scott MP (2007) Thirty-One Flavors of *Drosophila* Rab Proteins. *Genetics* 176:1307–1322. doi: 10.1534/genetics.106.066761
507. Zhao Y, Tang F, Lee D, Xiong W-C (2021) Expression of Low Level of VPS35-mCherry Fusion Protein Diminishes Vps35 Depletion Induced Neuron Terminal Differentiation Deficits and Neurodegenerative Pathology, and Prevents Neonatal Death. *Int J Mol Sci* 22:8394. doi: 10.3390/ijms22168394
508. Zhao Z, Sagare AP, Ma Q, Halliday MR, Kong P, Kisler K, Winkler EA, Ramanathan A, Kanekiyo T, Bu G, Owens NC, Rege S V, Si G, Ahuja A, Zhu D, Miller CA, Schneider JA, Maeda M, Maeda T, Sugawara T, Ichida JK, Zlokovic B V (2015) Central role for PICALM in amyloid- $\beta$  blood-brain barrier transcytosis and clearance. *Nat Neurosci* 18:978–987. doi: 10.1038/nn.4025
509. Zhong X, Hoelz DJ, Kumar HR, Sandoval JA, Rescorla FJ, Hickey RJ, Malkas LH (2009) Bin1 is linked to metastatic potential and chemosensitivity in neuroblastoma. *Pediatr Blood Cancer* 53:332–337. doi: 10.1002/pbc.22068
510. Zhou Y, Hayashi I, Wong J, Tugusheva K, Renger JJ, Zerbinatti C (2014) Intracellular clusterin interacts with brain isoforms of the bridging integrator 1 and with the microtubule-associated protein Tau in Alzheimer's Disease. *PLoS One* 9:1–11. doi: 10.1371/journal.pone.0103187
511. Zhu X-C, Yu J-T, Jiang T, Wang P, Cao L, Tan L (2015) CR1 in Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 51:753–65. doi: 10.1007/s12035-014-8723-8
512. Zito K, Parnas D, Fetter RD, Isacoff EY, Goodman CS (1999) Watching a Synapse Grow. *Neuron* 22:719–729. doi: 10.1016/S0896-6273(00)80731-X



# Annexes



**1- Annexe 1 : Tableau référençant les lignées de Drosophiles transgéniques utilisées dans ces travaux de thèse**

<u>Construction</u>	<u>Gène</u>	<u>Commentaire</u>	<u>Origine</u>
P{TRiP.HMS00653}attP2 AP-2 $\alpha$	AP-2 $\alpha$	RNAi	BL32866
AppI[d] w*	APPI	mutant	BL43632
w*; P{UAS-AppI.T}2	APPI	surexpression	BL38403
w[1118]; P{w[+mC]=UAS-APP.695.Exel}3 P{w[+mC]=UAS-MAPT.VTR}31K/TM6B Tb[1]	x	surexpression	BL33802
::UAS-BIN1-1 attP2 (68A4) #3	BIN1	BIN1-1 sauvage inséré sur le 3ème chromosome	
::UAS-BIN1-9 attP2 (68A4) #2	BIN1	BIN1-9 sauvage inséré sur le 3ème chromosome	
::UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP40/Cyo; #1	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 2ème chromosome. Lignée 1	générée au laboratoire

;UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP40/Cyo; #2	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 2ème chromosome. Lignée 2	générée au laboratoire
;UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP40/Cyo; #3	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 2ème chromosome. Lignée 3	générée au laboratoire
::UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP2/TM3sb #1	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 1	générée au laboratoire
::UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP2/TM3sb #2	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 2	générée au laboratoire
::UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP2/TM3sb #3	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 3	générée au laboratoire
::UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP2/TM3sb #4	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 4	générée au laboratoire
::UAS-BIN1-1 $\Delta$ CLAP attP2/TM3sb #5	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour le domaine CLAP. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 5	générée au laboratoire
;UAS-BIN1-1 $\Delta$ E7 attP40/Cyo; #1	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour l'exon 7. Insertion sur le 2ème chromosome. Lignée 1	générée au laboratoire

;UAS-BIN1-1ΔE7 attP40/Cyo; #2	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour l'exon 7. Insertion sur le 2ème chromosome. Lignée 2	générée au laboratoire
;UAS-BIN1-1ΔE7 attP40/Cyo; #3	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour l'exon 7. Insertion sur le 2ème chromosome. Lignée 3	générée au laboratoire
;UAS-BIN1-1ΔE7 attP2/Cyo; #1	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour l'exon 7. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 1	générée au laboratoire
;UAS-BIN1-1ΔE7 attP2/Cyo; #2	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour l'exon 7. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 2	générée au laboratoire
;UAS-BIN1-1ΔE7 attP2/Cyo; #3	BIN1	Forme tronquée de BIN1-1 pour l'exon 7. Insertion sur le 3ème chromosome. Lignée 3	générée au laboratoire
Rh1-Gal4;UAS GFP[ninaC];UAS BIN1-1#3 attP2	BIN1	Construction exprimant la GFP et l'isoforme 1 de BIN1 dans les rhabdomères des PRs externes (R1-6)	générée au laboratoire
UAS-ClathDN	Clathrine	mutant dominant-négatif	BL26821
::P[w+UAS-dPIP4K]attP2	dPIP4K	surexpression	Raghu P



PIP4K-HR29 (54)	dPIP4K	mutant	Raghu P
;p[w+UAS-dPIP4K-K/D]attP40;	dPIP4K	mutant Kinase Dead	Raghu P
;P{w[+mC]=GSV2}fwd[GS7301] / TM3	dPIP5K	surexpression	Raghu P
;P[w+HRPC30]/Cyo;	dPIP5K	Mutant dPIP5K[30]	Raghu P
;P[neo+FRT42D]P[w+HRPC18]/Cyo;	dPIP5K	Mutant dPIP5K[18]	Raghu P
UAS-GFP-myc-2xFYVE	FYVE		BL42712
P{y[+t7.7] v[+t1.8]=UAS-GFP.VALIUM10}attP2	GFP		BL35786
UAS-GFP.KDEL	KDEL		BL9898

UAS-GFP-LAMP	LAMP		BL42714
::UAS-lapIR	Lap	RNAi	Kyoto 2520R-1 (III)
::UAS-lapIR/TM3	Lap	RNAi	Kyoto 2520R-2 (III)
mwh1 P{hsneo}lap1 red1 e1/TM3 ryRK Sb1 Ser1 (strong hypomorph Zhang et al 1998)	Lap	mutant	BL10271
y1v1;P{TRiP.JF02994}attP2 Lap IR	Lap	RNAi	BL28358
CG2520[105767/KK]	Lap	RNAi	VDRC105767
y1 v1; P{y[+t7.7] v[+t1.8]=Lap TRiP.HMS01939} attP40	Lap	RNAi	BL39021
P{y[+mDint2] w[BR.E.BR]=SUPor- P}lap[KG06751] ry[506]/TM3 Sb[1] Ser[1]	Lap	mutant	BL14314

LapSD3/TM6B	Lap	mutant	A Genetic Screen for Synaptic Transmission Mutants Mapping to the Right Arm of Chromosome 3 in Drosophila Babcock MC et al
P{y[+t7.7] v[+t1.8]=UAS LUC.VALIUM10}attP2	Luciférase		BL35788
Rh1-Gal4;UAS GFP[ninaC];UAS Luciferase attP2	Luciférase	Construction exprimant la GFP et la Luciferase dans les rhabdomères des PRs externes (R1-6).	générée au laboratoire
UAS-ManII-EGFP	ManII		BL65248
UAS-mCD8:GFP	mCD8		BL27400
UAS-mCherry:NLS	mCherry		BL38424
w1118; P{GD7432}v38600 Mon1	Mon1	RNAi	VDRC38600
Mon1[CS084]/CyO P{sevRas1.V12}FK1	Mon1	mutant	BL64230

;UAS-Past1.EGFP>attP40/Cyo;	PAST1	surexpression	Rodal A
::past1[100-1]/TM6B	PAST1	mutant (délétion)	BL79616
::past1[60-4]/TM6B	PAST1	mutant (délétion)	BL79617
::P{y[+t7.7] v[+t1.8]=TRiP.HMS00557}attP2	PAST1	RNAi	BL33689 Raghu P
P{w[+mC]=UAS-Rab11-GFP}	Rab11	surexpression	BL8506
P{UASp-YFP.Rab11.Q70L}	Rab11	mutant constitutivement actif	BL9791
P{UASp-YFP.Rab11.S25N}	Rab11	mutant dominant-négatif	BL9792
P{UAS-Rab4-mRFP}	Rab4	surexpression	BL8505

P{w[+mC]=UAS-GFP-Rab5}	Rab5	surexpression	BL43336
P{UASp-YFP.Rab5.Q88L}	Rab5	mutant constitutivement actif	BL9771
P{UASp-YFP.Rab5.S43N}	Rab5	mutant dominant-négatif	BL9774
Rab5:EYFP	Rab5		BL62543
P{w[+mC]=UAS-Rab7.GFP}	Rab7	surexpression	BL42705
P{UASp-YFP.Rab7.Q67L}	Rab7	mutant constitutivement actif	BL24103
P{UASp-YFP.Rab7.T22N}	Rab7	mutant dominant-négatif	BL9778
Rab7:EYFP	Rab7		BL62545

UASp-YFP.Rab9	Rab9	surexpression	BL9784
P{TRiP.HMS00154}attP2 Shi	Shibire	RNAi	BL36921
UAS-Shibire[ts1];;UAS-Shibire[ts1]	Shibire	mutant thermosensible	Raghu P
w[*]; P{w[+mC]=UAS-shi[ts1].K}3	Shibire	mutant thermosensible	BL44222
w[1118] shi[1]	Shibire	mutant thermosensible endogène	BL7068
shi[2]	Shibire	mutant thermosensible endogène	BL2248
w[*]; shrb[G5] P{ry[+t7.2]=neoFRT}42D/CyO P{w[+mC]=GAL4-twi.G}2.2 P{UAS- 2xEGFP}AH2.2	Shrub	mutant	BL39635
P{w[+mC]=UAS-sktl.H}	Skittles	surexpression	BL39675

;sktI[Delta5]/CyO;	Skittles	mutant	BL39673
;UAS-Synj/Cyo;	Synaptojanine	surexpression	Verstreken P
UAS-synd/UAS-synd; synd [1D]/TM6	Synd	mutant [1D]	Kumar V
synd [ex22]/TM6	Synd	mutant [ex22]	BL1767
UAS-synd/Cyo;+/TM2	Synd	surexpression	issu de UAS-synd/UAS-synd; synd [1D]/TM6
P{TRiP.HMS01056}attP2 Vha68-2	Vha68-2	RNAi	BL34582
P{TRiP.HMS01442}attP2 VhaAC39-1	VhaAC39-1	RNAi	BL35029
y1 w*; PBac{UAS-Vps26.V5}VK00033/TM6B Tb1	Vps26	surexpression	BL67148

y1 v1; P{TRiP.HMS01769}attP40 vps26	Vps26	RNAi	BL38937
y1 w*; PBac{UAS-Vps35.HA}VK00033	Vps35	surexpression	BL67152
w*; P{neoFRT}42D Vps35MH20/CyO P{GAL4-Kr.C}DC3 P{UAS-GFP.S65T}DC7	Vps35	mutant	BL67202
rh1-Gal4;;rh1-GFP/TM2			
Cs10			
attP2 empty line			BL8622




**2- Annexe 2 : Publication “The Alzheimer susceptibility gene BIN1 induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects”**

RESEARCH

Open Access



# The Alzheimer susceptibility gene *BIN1* induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects

Erwan Lambert<sup>1†</sup>, Orthis Saha<sup>1†</sup>, Bruna Soares Landeira<sup>1</sup>, Ana Raquel Melo de Farias<sup>1,2</sup>, Xavier Hermant<sup>1</sup>, Arnaud Carrier<sup>3</sup>, Alexandre Pelletier<sup>3</sup>, Johanna Gadaut<sup>1</sup>, Lindsay Davoine<sup>1</sup>, Cloé Dupont<sup>1</sup>, Philippe Amouyel<sup>1</sup>, Amélie Bonnefond<sup>3</sup>, Frank Lafont<sup>4</sup>, Farida Abdelfettah<sup>1</sup>, Patrik Verstreken<sup>5,6</sup>, Julien Chapuis<sup>1</sup>, Nicolas Barois<sup>4,7</sup>, Fabien Delahaye<sup>3</sup>, Bart Dermaut<sup>8,9</sup>, Jean-Charles Lambert<sup>1</sup>, Marcos R. Costa<sup>1,2\*†</sup> and Pierre Dourlen<sup>1\*†</sup> 

## Abstract

The *Bridging Integrator 1* (*BIN1*) gene is a major susceptibility gene for Alzheimer's disease (AD). Deciphering its pathophysiological role is challenging due to its numerous isoforms. Here we observed in *Drosophila* that human *BIN1* isoform1 (*BIN1*iso1) overexpression, contrary to human *BIN1* isoform8 (*BIN1*iso8) and human *BIN1* isoform9 (*BIN1*iso9), induced an accumulation of endosomal vesicles and neurodegeneration. Systematic search for endosome regulators able to prevent *BIN1*iso1-induced neurodegeneration indicated that a defect at the early endosome level is responsible for the neurodegeneration. In human induced neurons (hiNs) and cerebral organoids, *BIN1* knock-out resulted in the narrowing of early endosomes. This phenotype was rescued by *BIN1*iso1 but not *BIN1*iso9 expression. Finally, *BIN1*iso1 overexpression also led to an increase in the size of early endosomes and neurodegeneration in hiNs. Altogether, our data demonstrate that the AD susceptibility gene *BIN1*, and especially *BIN1*iso1, contributes to early-endosome size deregulation, which is an early pathophysiological hallmark of AD pathology.

**Keywords:** *BIN1* isoforms, Neurodegeneration, Early endosome, Alzheimer's disease, *Drosophila*, Human induced neurons

## Introduction

Alzheimer's disease is the most common form of dementia, characterized by two main cerebral lesions: the extracellular aggregation of the amyloid beta peptide (A $\beta$ ) into senile plaques and the intracellular aggregation of phosphorylated Tau into tangles. In addition, other cytopathological features specific to familial and sporadic AD

can be also observed such as abnormally enlarged early endosomes in neurons [8]. At the genetic level, familial AD is due to mutations in *APP*, *PSEN1* and *PSEN2*. Sporadic AD is a multifactorial disease exhibiting a strong genetic component with an estimated attributable risk of 60–80% [20]. Over the last decade, our understanding of this genetic component has strongly progressed with the identification of 76 loci associated with the disease [4]. Among these loci, *BIN1* is the second AD susceptibility gene after *APOE* in terms of association [4, 33, 35].

*BIN1* encodes at least 20 exons subject to extensive differential splicing, generating multiple isoforms with different tissue distributions [49]. *BIN1* isoform1 (*BIN1*iso1) and *BIN1* isoform8 (*BIN1*iso8) are respectively expressed in the brain and skeletal muscles, the

\*Correspondence: marcos.costa@pasteur-lille.fr; pierre.dourlen@pasteur-lille.fr

<sup>†</sup>Erwan Lambert and Orthis Saha are co-first authors

<sup>‡</sup>Marcos R. Costa and Pierre Dourlen are co-last authors

<sup>1</sup> Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France

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



two tissues where *BINI* is mostly expressed, whereas *BINI* isoform9 (BIN1iso9) is ubiquitously expressed (GTEx portal, <http://www.gtexportal.org>). In the brain, BIN1iso1 and BIN1iso9 are the most abundant isoforms [11, 61]. All *BINI* isoforms possess the N terminal BIN1/Amphiphysin/Rvs (BAR) domain, involved in membrane curvature sensing and induction, the C-terminal MYC-Binding Domain (MBD) and the C-terminal SH3 domain, a protein–protein interaction domain that recognizes proline-rich domains like the one in Tau [49, 59]. Muscle-specific isoforms contain a phosphoinositide-interacting (PI) domain, whereas brain-specific *BINI* isoforms are mainly characterized by inclusion of exons encoding a Clathrin and Adaptor Protein-2 binding (CLAP) domain involved in endocytosis and intracellular trafficking. In the brain, a complex expression pattern is also observed at the cellular level. *BINI* expression is mainly observed in oligodendrocytes, microglial cells and neurons [1, 41, 52]. However, while neurons express high molecular weight isoforms including BIN1iso1, glial cells express lower molecular weight isoforms such as BIN1iso9 [52, 69].

AD-associated *BINI* variants are non-coding and likely regulate *BINI* expression [9]. However, the dysregulation of *BINI* expression in the brain of AD cases is still highly debated. Some results indicate that overall *BINI* expression is increased [9], or decreased [21, 41], whereas more complex patterns have been also reported with a decrease in BIN1iso1 and a concomitant increase in BIN1iso9 expression [24]. In addition, according to the pattern of expression, it is not clear if the observed variations of *BINI* expression are a cause or a consequence of the neurodegenerative process. For example, the decrease in BIN1iso1 and increase in BIN1iso9 expressions may be a consequence of neuronal death and gliosis, respectively, as *BINI* isoform variations are correlated with neuronal and glial marker variations [52]. Therefore, based on its global and/or isoform expression variation, it is difficult to assess whether BIN1 may be deleterious or protective in AD.

Importantly, impact of such global and/or isoform expression deregulations on the AD pathophysiological process has not yet been elucidated even if several hypotheses have been proposed: (i) modulation of Tau function and neurotoxicity through interaction of the BIN1 SH3 domain with the Tau proline-rich domain in a phosphorylation-dependent manner [39, 54, 59]; (ii) modulation of Tau spreading through its role in endocytosis and intracellular trafficking or extracellular vesicles [6, 11]; (iii) regulation of the APP metabolism despite contradictory results in different models [2, 62]; (iv) regulation of synaptic transmission either in the presynaptic [53] or postsynaptic compartment [56].

Within this complex background, considering the numerous *BINI* isoforms and the different functions regulated by this gene, it is, thus, pivotal to address isoform-specific functions of BIN1 towards a comprehensive understanding of its role in AD pathophysiology. For this purpose, we investigated the role and potential toxicity of *BINI* isoforms in neuronal cells by focusing on BIN1iso1, BIN1iso8 and BIN1iso9. We used the highly tractable and readout-rich *Drosophila* model which allowed the assessment of *BINI* isoform neurotoxicity in vivo during aging. We further analyzed the role of *BINI* isoforms in hiNs derived from human induced pluripotent stem cells (hiPSC), a model closer to AD pathology.

## Materials and methods

### *Drosophila* genetics and behavioral experiments

Flies were raised at 25 °C under a light/dark cycle of 12 h/12 h (3000 lx) on standard fly medium (Nutri-fly MF, Genesee Scientific, San Diego, CA, USA), unless otherwise stated. UAS-BIN1iso1, UAS-BIN1iso1 ΔEx7, UAS-BIN1iso1 ΔCLAP, UAS-BIN1iso9, UAS-BIN1iso8 and UAS-dAmphA lines were generated in this work (see Additional file 1). Briefly, cDNA were subcloned into pUASTattB vector and injected in attP2 lines (on the III chromosome) and in attP40 lines (on the II chromosome) (BestGene Inc., CA, USA). rh1-Gal4, GMR-Gal4, rh1-GFP, UAS-GFP:ninaC, UAS-evi:GFP, UAS-GFP:LC3 were described previously [13, 17, 36, 40]. The Amph<sup>5E3</sup> line was a kind gift from GL Boulianne [37]. Other stocks were obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (BDSC, Bloomington, IN, USA): UAS-Luciferase (#35788), UAS-mCD8:GFP (#27400), UAS-GFP (#35786), Amph<sup>MI08903-TG4.0</sup> (#77794), Rab5<sup>EYFP</sup> (#62543), Rab7<sup>EYFP</sup> (#62545), UAS-GFP-myc-2xFYVE (#42712), UAS-GFP-Rab5 (#43336), UAS-YFP.Rab5.Q88L (#9771), UAS-YFP.Rab5.S43N (#9774), Rab5<sup>[2]</sup> (#42702), P{TRiP.HMS00147}attP2 Rab5 (#34832), UAS-Rab7.GFP (#42705), UASp-YFP.Rab7.Q67L (#24103), UASp-YFP.Rab7.T22N (#9778), UAS-Rab11-GFP (#8506), UASp-YFP.Rab11.Q70L (#9791), UASp-YFP.Rab11.S25N (#9792), P{TRiP.HMS01056}attP2 Vha68-2 (#64582), P{TRiP.HMS01442}attP2 VhaAC39-1 (#35029), UAS-mCherry:NLS (#38424), attP2 empty line (#8622), UASp-YFP.Rab9 (#9784), Rab1<sup>EYFP</sup> (#62539), Rab6<sup>EYFP</sup> (#62544), UAS-GFP.KDEL (#9898), UAS-ManII-EGFP (#65248), UAS-GFP-LAMP (#42714), Appl[d] (#43632), UAS-App1 (#38403), UAS-APP695 (#33796), UAS-YFP:Rab4 (#23269), UAS-YFP:Rab4[S22N] (#9768), UAS-YFP:Rab4[Q67L] (#9770), UAS-Rab4:mRFP (#8505) and UAS-mCD8:mRFP (#27400).

For the climbing test, 5 flies were subjected together to testing in a graduated cylinder. The wall of the cylinder had 5 main graduations, the top one being 13 cm from

the bottom. Flies were tapped down to the bottom of the cylinder and recorded for 10 s to see if they climbed up the wall of the cylinder. This was repeated 5 times in total. A score corresponding to the distance they had climbed was determined by the recorded movies. Flies got a score of between 0 and 5 depending on the main graduation that they were able to reach during the 10 s period. The mean of the 5 trials was calculated and attributed to each fly.

#### Western blot of *Drosophila* samples

*Drosophila* heads (n=10) and thorax (n=5) were dissected and crushed in ice-cold LDS lysis buffer (NP0008, NuPAGE, Novex, Life Technologies) supplemented with reducing agent (NP0009, NuPAGE, Novex, Life Technologies). Samples were centrifuged at 8500g for 10 min at 4 °C. Supernatants were kept at -80 °C. Once thawed, they were boiled for 10 min at 85 °C before being loaded and separated in SDS-polyacrylamide gels 4–12% (NuPAGE Bis-Tris, ThermoScientific) in MOPS 1X buffer (NP0001-02, NuPAGE, Novex, Life Technologies). After migration, samples were transferred on to nitrocellulose membranes using the Biorad Trans-blot transfert system kit (Biorad) according to the supplier technical recommendation (7 min, 2.5 A, 25 V). Next, membranes were incubated in milk (5% in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20) to block non-specific binding sites during 1 h at RT, followed by several washes. Immunoblotting was carried out with primary antibodies anti-BIN1 (BIN1 99D, 05-449, Millipore, RRID:AB\_309738, 1/2500; BIN1 ab27796, abcam, RRID:AB\_725699, 1/1000), anti- $\alpha$ -tubuline ( $\alpha$ -tubuline DM1A, T9026, Sigma, RRID:AB\_477593, 1/5000), anti-dAmph (#9906, kind gift of Andrew Zelhof, 1/5000)[67] and anti-GFP (anti-GFP, G1544, Sigma, RRID:AB\_439690, 1/4000) overnight at 4 °C. After washing, membranes were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson, anti-mouse 115-035-003, RRID:AB\_10015289 and anti-rabbit 111-035-003, RRID:AB\_2313567) 2 h at room temperature. Immunoreactivity was revealed using the ECL chemiluminescence system (WBLUC0500, Immobilon Classico Western HRP Substrate, Millipore) and imaged using the Amersham Imager 600 (GE LifeSciences). Optical densities of bands were quantified using Fiji software and results were normalized with respect to tubulin expression [55].

#### Cornea neutralization

CO<sub>2</sub>-anesthetized flies were placed in a 35 mm cell culture dish half-filled with 1% agarose and covered with water at 4 °C as described [14]. Flies were observed using an upright confocal microscope (Zeiss LSM710, Wetzlar, Germany) equipped with a 40 $\times$  water immersion

long-distance objective. Images were acquired using the Zen acquisition software (Zeiss Zen software). Photoreceptor neurons were manually quantified.

#### Immunofluorescence of *Drosophila* samples

Fly heads were dissected and fixed in 4% paraformaldehyde phosphate buffer saline (PBS) for 20 min at room temperature. After washing, retinas were finely dissected, permeabilized and depigmented in 0.3% (v/v) Triton X-100 in PBS (0.3% PBT) overnight at 4 °C under gentle agitation. After blocking with 5% normal goat/donkey serum in 0.3% PBT, samples were incubated overnight at 4 °C with the primary antibodies diluted in 0.3% PBT. The following antibodies were used: anti-NA/K ATPase alpha subunit ( $\alpha$ 5, DSHB, RRID:AB\_2166869, 1/100), anti-rhodopsin (4C5, DSHB, RRID:AB\_528451, 1/200) and anti-GFP (132004, Synaptic System, RRID:AB\_11041999, 1/100). After washing, they were incubated overnight at 4 °C with Alexa 555 Phalloidin anti-F-actin (A34055, ThermoFisher Scientific) and the secondary antibodies diluted in 0.3% PBT: Alexa 488 Donkey anti-guinea pig (706-545-148, RRID:AB\_2340472, Jackson ImmunoResearch), Alexa 633 Goat anti-mouse (A-21052, RRID:AB\_2535719, ThermoFisher Scientific). After washing, samples were incubated in 90% glycerol PBS for 30 min in the dark before being mounted in the same solution. Retinas were imaged with a LSM710 confocal microscope (Zeiss, Wetzlar, Germany) equipped with a 40X oil objective.

#### Electron microscopy

*Drosophila* eyes were dissected and fixed in 1% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, 0.1 M sodium cacodylate buffer (pH 6.8) 30 min at room temperature and then overnight at 4 °C. After washing, eyes were post-fixed at room temperature in 1% OsO<sub>4</sub> and 1.5% potassium ferricyanide for 1 h, then with 1% uranyl acetate for 45 min, both in distilled water at room temperature in the dark. After washing, they were dehydrated with successive ethanol solutions. Eyes were infiltrated with epoxy resin (EMbed 812 from EMS) and were mounted in resin into silicone embedding molds. Polymerization was performed at 60 °C for 2 days. Ultrathin sections of 70–80 nm thickness were observed on formvar-coated grid with a Hitachi H7500 TEM (Milexia, France), and images were acquired with a 1 Mpixel digital camera from AMT (Milexia, France).

#### Maintenance of cells and generation of hiPSCs and neural derivatives

hiPSCs (ASE 9109, Applied StemCell Inc. CA, USA) modified for BIN1 in exon 3 (Fig. 5) were generated by CRISPR/Cas9. Homozygous null mutants for BIN1 had

a 5 bp deletion on one allele and an 8 bp deletion on the other allele. All hiPSCs, and all subsequent human induced neural progenitor cells (hiNPCs), hiNs, human induced astrocytes (hiAs), and cerebral organoids derived thereof, were maintained in media from Stemcell Technologies, Vancouver, Canada. Maintenance of cell cultures and organoids were done in adherence with manufacturer's protocols which can be found on the webpage of Stemcell Technologies. hiPSCs were maintained in mTeSR1 medium in non-treated cell culture dishes/plates pre-coated with vitronectin. Cell numbers and viability were recorded using a LUNA™ Automated Cell Counter.

In order to obtain hiNPCs, the embryoid body method detailed by Stemcell Technologies was used for the induction of BIN1 WT and KO hiPSCs. Following the generation of hiNPCs, these derived cells were maintained in treated cell culture dishes pre-coated with poly-L-ornithine (PLO) and laminin (5 µg/mL). PLO solution was made in water (0.001%) while laminin was diluted in PBS with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. BIN1 WT and KO hiNPCs, thus generated, were maintained for up to 10 passages.

2D cultures comprising hiNs and hiAs were produced from hiNPCs. 60,000 hiNPCs/well were plated in 24-well cell imaging plates from Eppendorf (Cat # 0030741005) pre-coated with PLO (0.001%) and laminin (10 µg/mL). Cells were kept in 0.5 mL of NPC medium per well for 24 h. Following this, equal volume of complete BrainPhys medium (supplemented with BDNF, GDNF, laminin, dibutyl-cAMP, ascorbic acid, N2, and SM1) was added to each well to begin the process of differentiation. Subsequently, media was changed in the plates bi-weekly. The media change consisted of removing half of the existing medium in each well and replacing it with an equal volume of fresh complete BrainPhys medium. Mixed cultures of hiNs and hiAs were obtained at the end of 6 weeks from the start of the differentiation process.

### Generation of cerebral organoids

Cerebral Organoids were generated from hiPSCs at 80% confluency. hiPSCs were detached from the Vitronectin XF substrate using Gentle Cell Dissociation Reagent (Stemcell Technologies), centrifuged, pelleted and resuspended in Embryoid Body (EB) seeding medium (Stemcell Technologies) to form EBs. 9000 cells were plated per well in a 96-well round-bottom ultra-low attachment plate. After two days, 1 or 2 EBs were transferred to a well of a 24-well ultra-low attachment plate containing Induction Medium (Stemcell Technologies). The EBs were kept in the induction Medium for 2 days and next they were transferred into Matrigel (Corning) using an embedding surface. When the Matrigel polymerized, the EB were transferred to a 6-well ultra-low adherent plate

with Expansion Medium (Stemcell Technologies). After 3 days, the medium was replaced by Maturation Medium (Stemcell Technologies) and the plate was placed in an orbital shaker (65 rpm speed). Complete media changes were done on a bi-weekly basis.

### Lentiviral infections

Lentiviral constructs were produced by the Vect'UB platform within the TBM Core unit at University of Bordeaux, Bordeaux, France (CNRS UMS 3427, INSERM US 005). All three lentiviral constructs harbored reporter tags for the expression of tdTomato protein. The lentiviral vectors used were the empty vector—436 (ID # 1770), 436-Bin1Iso1 (ID # 1771), and 436-Bin1Iso9 (ID # 1772). Lentiviral infections were done in 3-week old differentiation cultures obtained from hiNPCs. Viral transductions were performed at a multiplicity of infection (MOI) of 1. In brief, appropriate volumes of each construct were mixed in complete BrainPhys medium and 50 µl of the viral medium mix was then added to each well. Each of the 3 constructs were added in triplicate to respective wells for each of the BIN1 WT and KO cells. Infected cells were maintained for a further 3-week period with bi-weekly changes of half volume of medium in each well.

### Immunocytochemistry of 2D cultures

Cells were fixed in PFA (4% w/v) for 10 min. Fixed cells were then washed with PBS 0.1 M. Cells were then blocked with blocking solution (5% normal donkey serum + 0.1% Triton X-100 in PBS 0.1 M) at room temperature for 1 h under shaking conditions. Primary antibodies diluted in the blocking solution were then added and incubation was done overnight at 4°C under shaking conditions. The following day, cells were washed with PBS 0.1 M 3 times for 10 min each before the addition of fluorophore-conjugated secondary antibodies in blocking solution for 2 h at room temperature under shaking conditions ensuring protection from light. 3 washes with PBS were done for 10 min each at room temperature under shaking conditions with protection from light. Hoechst 33258 nucleic acid stain was added to PBS 0.1 M in the second wash. Cells were mounted with fluoromount and imaged directly in the cell imaging plates. All images were acquired using an LSM 880 Confocal Scanning Microscope housed at the Imaging Platform of the Institut Pasteur de Lille using the ZEISS ZEN Imaging Software. Image acquisition was done at 40X for the various cellular markers in Fig. 5. For EEA1 quantifications, we selected 10 random regions positive for MAP2 in 2–3 different wells from 3 independent cell culture batches. Images were taken using a 63X objective and zoom of 2.



### Immunohistochemistry of organoid samples

Cerebral organoids were fixed in PFA (4% w/v) for 30 min at 4 °C followed by three washes with PBS 0.1 M. Cerebral organoids were then placed in sucrose solution (30% w/v) overnight before being embedded in O.C.T (Tissue-Tek). Embedded tissue was sectioned at 20 µm using a cryostat and mounted slides were stored at –80 °C until immunostaining was performed. Mounted tissue was removed from storage and warmed by placing at room temperature for 30 min. Tissue were rehydrated and washed with room temperature PBS 0.1 M 3 times for 5 min. Slides were then washed once with PBS with 0.2% Triton X-100 for 15 min. Tissue was blocked using 10% of donkey serum in PBS 0.1 M for 1 h at room temperature. After blocking, primary antibodies were added to 0.2% Triton X-100 and 10% of donkey serum in PBS 0.1 M at appropriate dilutions and incubated overnight at 4 °C. The next day, slides were washed with PBS 0.1 M 3 times for 5 min each with gentle shaking. Subsequently, slides were incubated with fluorophore-conjugated secondary antibodies in 0.2% Triton X-100 and 10% of donkey serum in PBS 0.1 M for 2 h at room temperature in the dark. After secondary antibody incubation, slides were washed 3 times with PBS for 5 min with gentle shanking. Nuclei were visualized by incubating the tissue for 5 min with Hoechst stain in PBS 0.1 M. Sections were mounted using aqueous mounting medium (Polysciences). Images were acquired using an LSM 880 Confocal Scanning Microscope in concert with the ZEISS ZEN imaging software housed at the Imaging Platform of the Pasteur Institute, Lille. For EEA1 quantifications, we selected 5 random regions in the surface (50–250 µm) of each cerebral organoid, where a high density of MAP2-positive cells could be distinguished. Images were acquired using a 63X objective in 2–3 different sections obtained from at least 3 cerebral organoids of each genotype.

### Antibodies used for immunocytochemistry/immunohistochemistry of hiNs and organoid samples

hiPSCs were detected with antibodies for SOX2 (RRID:AB\_2651000) and SSEA4 (RRID:AB\_2651001) using the Molecular Probes™ Pluripotent Stem Cell 4-Marker Immunocytochemistry Kit (Thermo Fisher Scientific, RRID:AB\_2651000). Antibodies used for immunocytochemistry/immunohistochemistry were EEA1 (610457, BD Biosciences, RRID:AB\_397830), MAP2 (188006, Synaptic Systems, RRID:AB\_2619881), RFP (600-401-379, Rockland Immunochemicals, Inc., RRID:AB\_2209751), SOX2 (14-9811-82, Invitrogen, RRID:AB\_11219471), NESTIN (MAB5326, Millipore, RRID:AB\_2251134), and GFAP (AB5804, Millipore, RRID:AB\_2109645). All fluorophore-tagged secondary

antibodies were sourced from JascKon ImmunoResearch Europe Ltd.

### Immunoblotting of 2D cultures and cerebral organoid

Samples from the 2D cultures or brain organoids were collected in RIPA buffer containing protease inhibitors (Complete mini, Roche Applied Science, Penzberg, Germany) and sonicated two times at 60–70% during 10 s before use for the western blotting analyses.

Protein quantification was performed using the BCA protein assay (Thermo Scientific). In total, 10 µg of protein from extracts were separated in SDS–polyacrylamide gels 4–12% (NuPAGE Bis–Tris, Thermo Scientific) and transferred to nitrocellulose membranes (Bio-Rad). Next, membranes were incubated in milk (5% in Tris-buffered saline with 0.1% Tween-20 – TTBS, or SuperBlock – Thermo Scientific) to block non-specific binding sites during 1 h at RT, followed by several washes with TTBS. Immunoblottings were carried out with primary antibodies anti-BIN1 (ab182562, Abcam, RRID:AB\_725699), anti-APP (C-terminal) (A8717, Sigma-Aldrich, RRID:AB\_258409) and anti-β-ACTIN (A1978, Sigma-Aldrich, RRID:AB\_476692) overnight at 4 °C on 20 RPM agitation. The membranes were washed three times in TTBS, followed by incubation with HRP-conjugated secondary antibodies anti-mouse (115-035-003, RRID:AB\_10015289) and anti-rabbit (111-035-003, RRID:AB\_2313567, Jackson ImmunoChemicals, Inc.) overnight at 4 °C on 20 rpm. The membranes were washed three times in TTBS, and the immunoreactivity was revealed using the ECL chemiluminescence system (SuperSignal, Thermo Scientific) and imaged using the Amersham Imager 600 (GE Life Sciences). Optical densities of bands were quantified using the Gel Analyzer plugin in Fiji – ImageJ [55].

### Image analysis using Imaris

The “surface” function on Imaris was used for detection of EEA1 puncta. Background subtraction was performed using “local contrast” and automatic threshold, warranting the same processing criteria for all images. Next, a manual filter cut-off was applied to detect all puncta volumes above 0.1 µm<sup>3</sup>. MAP2 and tdTomato surfaces were also detected based on background subtraction using “local contrast” and automatic threshold. Automatic thresholds using the filter “absolute intensity” were then applied to find MAP2 and tdTomato surfaces. For the detection of EEA1 puncta on MAP2 and EEA1 puncta on MAP2<sup>+</sup>/tdTomato<sup>+</sup> cells, filters for the standard deviation of intensity were applied in the MAP2 and tdTomato channels respectively. Volume information for the EEA1 puncta were collated from each acquired image as CSV files. The volumes were sorted using Microsoft Excel. We

used a cut-off maximum volume of  $10\mu\text{m}^3$  for each field. The sorted volume data were then analyzed statistically using the GraphPad Prism software.

#### snRNA-seq library preparation

Nuclei isolation and Hash-tagging with oligonucleotides steps were realized on ice with pre-cold buffers and centrifugations at  $4^\circ\text{C}$ . BIN1 WT and KO organoids of 6 months ( $n=4$  per genotype) were cut in 2 parts, washed twice with 1 ml of Deionized Phosphate Buffer Saline 1X (DPBS, GIBCO™, Fisher Scientific 11590476) and centrifuged 5 min at 300g. Organoids pellets were resuspended in 500  $\mu\text{l}$  lysis buffer (Tris-HCL 10 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, Tween-20 0.1%, Nonidet P40 Substitute 0.1%, Digitonin 0.01%, BSA 1%, Invitrogen™ RNaseout™ recombinant ribonuclease inhibitor 0.04 U/ $\mu\text{L}$ ). Multiple mechanical resuspensions and wrecking steps in this buffer were performed for a total lysis time of 10 min, 500  $\mu\text{l}$  of washing buffer was added (Tris-HCL 10 mM, NaCl 10 mM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, Tween-20 0.1%, BSA 1%, Invitrogen™ RNaseout™ recombinant ribonuclease inhibitor 0.04 U/ $\mu\text{L}$ ) and the lysis suspension was centrifuged 8 min at 500g (used for all following centrifugation steps). Nuclei pellets were washed three times with one filtration step by MACS pre-separation filter 20  $\mu\text{m}$  (Miltenyi Biotec). Nuclei pellets were resuspended in 100  $\mu\text{L}$  of staining buffer (DPBS BSA 2%, Tween-20 0.01%), 10  $\mu\text{L}$  of Fc blocking reagent HumanTruStainFc™ (422302, Biolegend) and incubated 5 min at  $4^\circ\text{C}$ . 1  $\mu\text{l}$  of antibody was added (Total-Seq™-A0451 anti-Vertebrate Nuclear Hashtag 1 MAb414 for the WT and Total-Seq™-A0453 anti-Vertebrate Nuclear Hashtag 3 MAb414 10  $\mu\text{g}$  for the KO, 97284 and 97286 respectively, Biolegend) and incubated 15 min at  $4^\circ\text{C}$ . Nuclei pellets were washed three times in staining buffer with one filtration step by MACS pre-separation filter 20  $\mu\text{m}$  (Miltenyi Biotec) to a final resuspension in 300  $\mu\text{l}$  of staining buffer for Malassez cell counting with Trypan blue counterstaining (Trypan Blue solution, 11538886, Fisherscientific). Isolated nuclei were loaded on a Chromium 10 $\times$  Genomics controller following the manufacturer protocol using the chromium single-cell v3 chemistry and single indexing and the adapted protocol by Biolegend for the HTO library preparation. The resulting libraries were pooled at equimolar proportions with a 9 for 1 ratio for Gene expression library and HTO library respectively. Finally, the pool was sequenced using 100 bp paired-end reads on the Illumina NovaSeq 6000 system following the manufacturer recommendations.

#### snRNA-seq analysis and differential expression analysis

UMI Count Matrices for gene expression and for HTO libraries were generated using the CellRanger software

(10 $\times$  Genomics). After filtering for low quality cells according to the number of RNA, genes detected, and percentage of mitochondrial RNA, and normalizing the HTO matrix using centered log-ratio (CLR) transformation, 2,990 cells were assigned back to their sample of origin using HTODemux function of the SeuratV3 R Package (Satijalab), resulting to 1,794 and 1,196 cells for BIN1 KO and WT, respectively. Then, Seurat Workflow with SCTransform normalization was used to cluster the cells according to their transcriptome similarities. Each cluster was annotated using cell type specific markers. Finally, differential expression analysis between BIN1 KO and WT cells within each identified cell type was performed using DESeq2 package [38].

#### Statistical analyses

Statistical information are available in the method section and in the figure legends. Two-tailed statistical tests were used. Hypothesis testing was carried out with Kruskal Wallis test followed by Mann-Whitney comparison and ANOVA with post-hoc Tukey. Statistical analyses were performed using R 3.6.0 (R Core Team (2019). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>), RStudio 1.2.1335 and GraphPad Prism. For boxplots, the bold segment, lower and upper hinges represent the median, first quartile and third quartile respectively. The upper whisker extends from the hinge to the largest value no further than  $1.5 * \text{IQR}$  from the hinge (where IQR is the inter-quartile range, or distance between the first and third quartiles). The lower whisker extends from the hinge to the smallest value at most  $1.5 * \text{IQR}$  of the hinge.

## Results

### Functional conservation of human BIN1 isoforms in Drosophila

*BIN1* belongs to the amphiphysin family and in mammals, two genes compose this family: *amphiphysin I* (*AMPH*) and *amphiphysin II* (*AMPH2*) also named *BIN1*. *Drosophila* has only one ortholog called *Amphiphysin* (*Amph*) that is referred to as *dAmph* henceforth in this article. *dAmph* has 3 isoforms but only the BAR and SH3 domains are conserved in *dAmph*. Within this background, we generated 3 transgenic *Drosophila* lines expressing the human BIN1iso1, BIN1iso8 and BIN1iso9 isoforms. As a control, we also generated transgenic *Drosophila* lines expressing the longest *dAmph* isoform, *dAmphA* (Fig. 1a). We obtained transgenic lines expressing identical basal level of BIN1 isoforms with two additional BIN1iso1 and BIN1iso9 lines expressing high BIN1 levels that we used for dose-dependent effects (Additional file 1 and Additional file 2: Fig. S1).

We assessed the functional conservation of human BIN1 isoforms in *Drosophila*. Like human subjects harboring *BIN1* coding mutations and suffering myopathy [44], *dAmph* null flies have locomotor defects, due to T-tubule morphogenesis defects in muscle cells [37, 67]. We tested if the expression of muscle human BIN1iso8 could restore the locomotor performance of *dAmph* deficient adult transgenic flies assessed in the so-called climbing test. In addition to the null *dAmph*<sup>5E3</sup> allele, we took advantage of a *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0</sup> allele that allows Gal4 expression under the control of *dAmph* endogenous promoter while stopping *dAmph* transcription (Additional file 1 and Additional file 3: Fig. S2). We checked by western blot that *dAmph* expression was abolished in *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/5E3</sup> compound heterozygous flies compared to *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/+</sup> heterozygous flies and that BIN1iso8 could be expressed in this genetic background (Fig. 1b). Then, we observed that *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/5E3</sup> compound heterozygous flies had locomotor defects like *dAmph*<sup>5E3/5E3</sup> null flies compared to control flies or *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/+</sup> heterozygous flies (Fig. 1c). Expression of human BIN1iso8 restored the locomotor abilities of *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/5E3</sup> compound heterozygous flies to levels similar to the ones observed in control flies or *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/+</sup> heterozygous flies (Fig. 1c). Thus, human BIN1iso8 is able to rescue the locomotor functions of *dAmph* null flies, thereby indicating a functional conservation of human BIN1iso8 in *Drosophila*.

Next, we addressed the possible functional conservation of BIN1 isoforms in neuronal cells. Overexpression of *dAmphA* results in development defects of the light-sensitive photoreceptor neurons in *Drosophila* retina [67]. These neurons possess a specialized compartment, called rhabdomere, which consists of an apical microvillar stack of actin-rich intricately folded membranes containing the light-sensing rhodopsin proteins. We tested if human BIN1 isoforms expression with the early

eye-specific GMR driver could phenocopy the *dAmphA*-induced rhabdomere phenotype. The *Drosophila* eye is composed of 600–800 units called ommatidia. Each ommatidium contains 6 outer photoreceptor neurons and 2 superimposed inner photoreceptor neurons. We expressed GFP in the outer photoreceptor neurons (Rh1 driver) and used the cornea neutralization technique to assess rhabdomere morphology [13]. While we observed six rhabdomeres per ommatidium, of similar size and organized in a trapezoidal shape in the control condition, some rhabdomeres were missing and others were smaller or deformed in the *dAmphA* overexpressing condition (Fig. 1d). Thus, we confirmed that expression of *dAmphA* alters rhabdomere morphogenesis. Individual expression of BIN1iso1, BIN1iso8 or BIN1iso9 recapitulated a similar phenotype respectively (Fig. 1d). In addition, high levels of BIN1iso1 and BIN1iso9 exacerbated the phenotype indicating a dose-dependent effect. We also confirmed these results on whole-mount pupal retina dissection (Fig. 1e). *dAmphA*-, BIN1iso1-, BIN1iso8- and BIN1iso9-overexpressing retina exhibited strong deformed accumulations of F-actin at the level of the rhabdomere. In conclusion, overexpression of all human BIN1 isoforms phenocopied *dAmphA* overexpression during the development of photoreceptor neurons suggesting functional conservation also at the neuronal level.

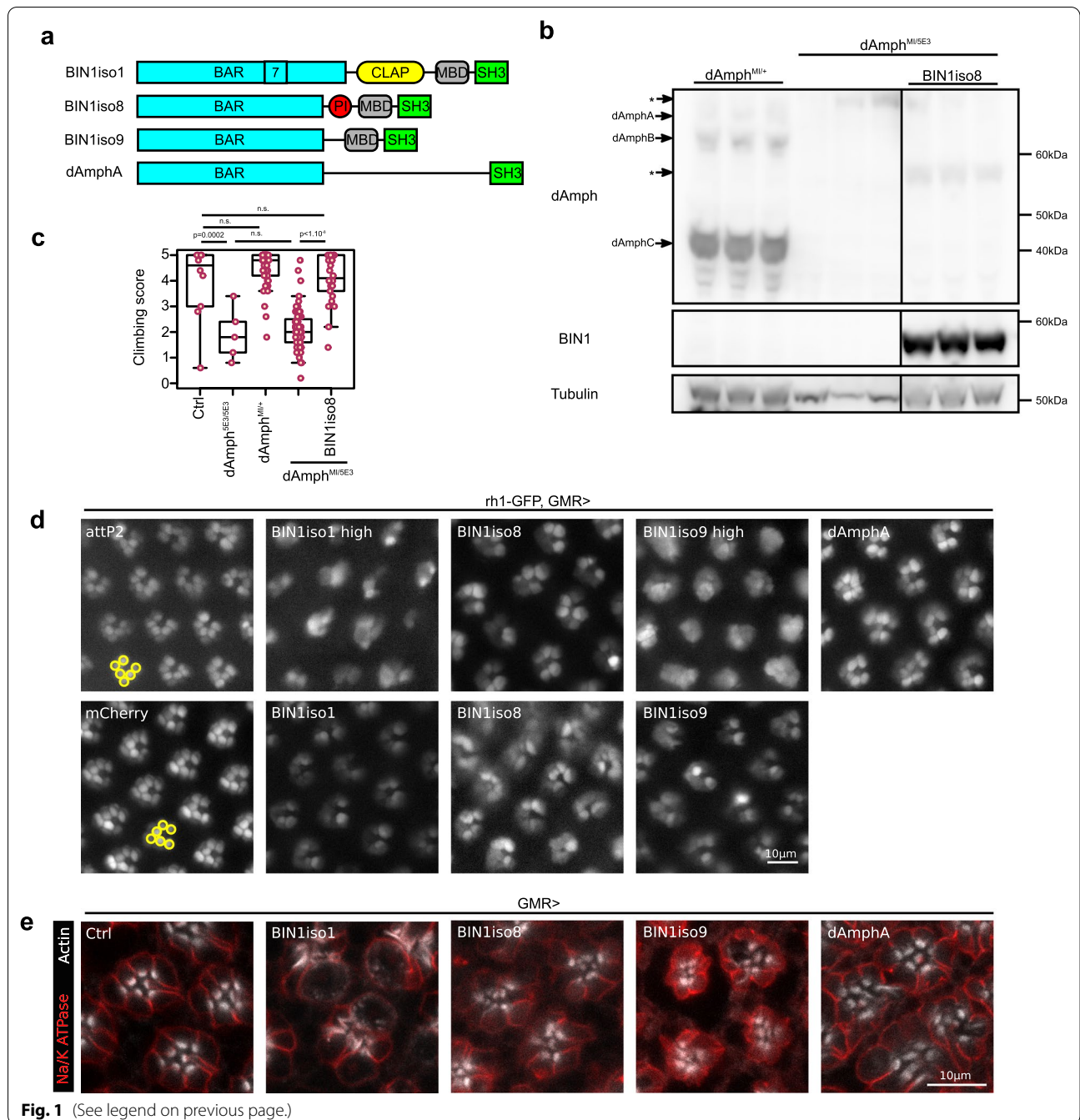
#### Human BIN1iso1 is neurotoxic in *Drosophila* photoreceptor neurons

The neurotoxic effects of human BIN1 isoforms in the developing *Drosophila* prompted us to investigate whether a similar effect could also be observed after expression of BIN1 isoforms in adult *Drosophila*. To do so, we employed the outer photoreceptor-specific driver Rh1, active in photoreceptor neurons after rhabdomere morphogenesis at the end of pupal development. We quantified the number of outer photoreceptor neurons following cornea neutralization and rhabdomere

(See figure on next page.)

**Fig. 1** Functional conservation of human BIN1 isoforms in *Drosophila*. **a** Scheme of cerebral human BIN1 isoform1 (BIN1iso1), muscular human BIN1 isoform8 (BIN1iso8), ubiquitous human BIN1 isoform9 (BIN1iso9) and *Drosophila* BIN1, called Amphiphysin, isoformA (*dAmphA*) for which transgenic lines were generated. **b** Western blot analysis of *Amph* and BIN1 expression in *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/+</sup>, *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/5E3</sup> and *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/+</sup>; UAS-BIN1iso8 fly thorax. *dAmphA*, *dAmphB* and *dAmphC* were expressed in the heterozygous *dAmph*<sup>MI08903/+</sup> flies, whereas they were not detected in *dAmph*<sup>MI08903/5E3</sup> flies (\*background staining). BIN1iso8 was expressed in *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/+</sup>; UAS-BIN1iso8 flies. **c** Analysis of the climbing locomotor activity of 2 day-old flies with the indicated genotype. *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/5E3</sup> flies exhibited a similar low climbing score as the null *dAmph*<sup>5E3/5E3</sup> flies. Expression of BIN1iso8 rescued the locomotor defects of *dAmph*<sup>MI08903-TG4.0/5E3</sup> flies (from left to right n = 10, 5, 49, 67, 26, ANOVA F-value = 66.15, Df = 4, p = 2.37 × 10<sup>-38</sup> with post-hoc Tukey, n.s. not significant). **d** Visualization of outer photoreceptor neuron rhabdomeres by cornea neutralization in 2-day-old flies expressing mCherry (as a control), BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9 and *dAmphA* under a GMR driver (attP2 is a control with an empty attP2 landing site and no UAS construct). While each ommatidium contained 6 outer photoreceptors organized in a trapezoid shape (yellow circles) in the two control conditions, BIN1 isoforms and *dAmphA* expression resulted in a strong alteration in the number, shape and trapezoid organization of the rhabdomeres with a stronger effect for BIN1iso1 and BIN1iso9 high-expressing lines. **e** Immunofluorescence of whole-mount pupal retina expressing Luciferase (as a control), BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9 or *dAmphA*. They were labelled for the plasma membrane neuronal Na/K ATPase and F-actin. Contrary to the control, BIN1iso1, BIN1iso8, BIN1iso9 and *dAmphA* induced a strong accumulation of F-actin at the level of the rhabdomere





**Fig. 1** (See legend on previous page.)

visualization. We observed that young flies (1 day-old) had a normal number of outer photoreceptor neurons (6 per ommatidium) with normal morphology (Fig. 2a, b). These observations indicated that the use of rh1 driver bypasses the developmental retinal defects observed using the GMR driver. We then observed that 4-week-old flies expressing BIN1iso1, but not the ones expressing BIN1iso8, BIN1iso9 and dAmphA, lost around half of their outer photoreceptor neurons (Fig. 2a, b). This

phenotype was not dose-dependent as flies expressing basal or high BIN1iso1 levels had a similar outer photoreceptor neuron loss. Of note, flies expressing high levels of BIN1iso9 had nearly no loss of outer photoreceptor neurons (Fig. 2a–d). In conclusion, expression of BIN1iso1 induced a progressive neurodegeneration in adult *Drosophila* photoreceptor neurons and this effect was isoform-specific and not dose-dependent.

Since photoreceptor neurons are specialized neurons highly dependent on the phototransduction cascade [64], we wondered if a defect in this phototransduction cascade may be the cause of the neurodegeneration. For this purpose, we assessed whether the degeneration was light-dependent. BIN1iso1-expressing flies were allowed to age in the normal 12 h/12 h light/dark cycle or under constant dark condition for 4 weeks. Light absence did not prevent outer photoreceptor neurodegeneration even if occurring to a lesser extent (Fig. 2e). This indicated that the phototransduction cascade was not the main cause of the neurodegeneration and that increased global neuronal activity favors BIN1iso1-induced neurodegeneration.

We asked why BIN1iso1 was more toxic for photoreceptor neurons than the other BIN1 isoforms. We wondered whether it could originate from the subcellular localization of BIN1 isoforms. We labelled retinas of 1-day old flies expressing either BIN1iso1, BIN1iso8 or BIN1iso9 for BIN1 (Fig. 2f). All BIN1 isoforms were similarly enriched at the base of photoreceptor neuron rhabdomeres. We next wondered what in the sequence of BIN1iso1 makes it neurotoxic. BIN1iso1 differs from BIN1iso9 by two sequences: (i) the Exon7 in the BAR domain and (ii) the neuronal specific CLAP domain. We tested the neurotoxicity of truncated BIN1iso1 forms for these two sequences (Fig. 2g) after generating the corresponding transgenic flies (Additional file 4: Fig. S3) and observed that loss of the CLAP domain abrogated outer photoreceptor neurodegeneration contrary to the loss of Exon7, which only partially rescued photoreceptor neurons (Fig. 2h). Hence, the BIN1iso1-induced degeneration depends on its CLAP domain and to a lesser extent on the Exon7 in the BAR domain. Since the CLAP domain is known to interact with AP-1 adaptin, AP-2 adaptin and the Clathrin Heavy Chain, which are involved in endocytosis and intracellular trafficking [26, 50, 65], this suggested that the cause of the degeneration could be a defect in endocytosis/intracellular trafficking.

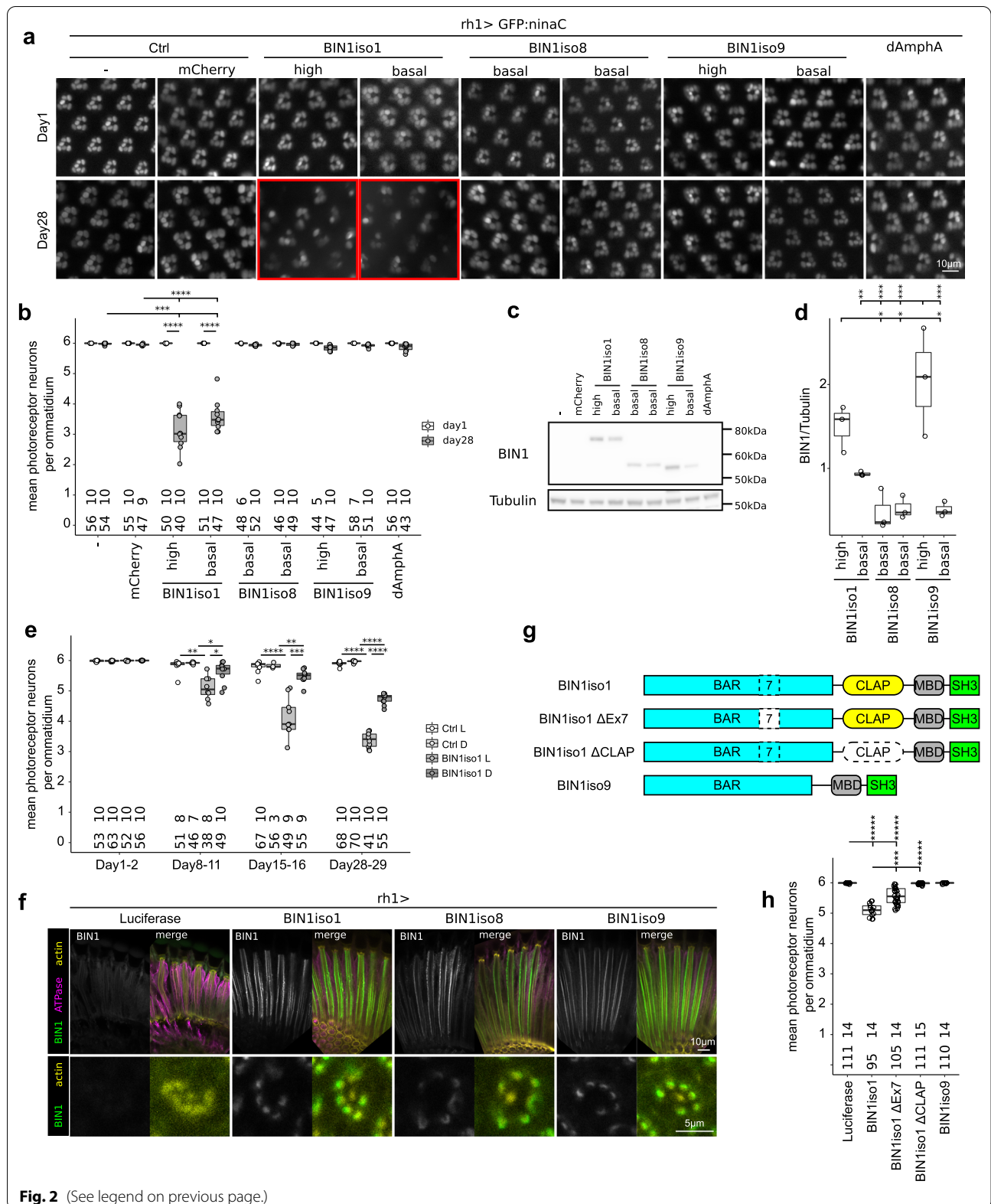
### BIN1iso1 induces vesicle accumulation in photoreceptor neurons

To further understand the cause of the BIN1iso1-induced degeneration, we analyzed the degenerating photoreceptor neurons by electron microscopy. While neurons in 15-day-old flies either expressing luciferase, BIN1iso9 or dAmphA did not show any abnormalities, the degenerating neurons in BIN1iso1 flies exhibited a strong accumulation of vesicles (Fig. 3a and Additional file 5: Fig. S4a). These vesicles were of various sizes, some of them nearly as big as a complete ommatidium. The cytoplasm of some photoreceptor neurons was filled with vesicles, compacting it against the plasma membrane, which seemed intact. The vesicles were surrounded by a single membrane and not a double membrane as observed in autophagosome (Fig. 3a) and did not have any specific content. Rhabdomeres of BIN1iso1 photoreceptor neurons were disintegrated, whereas the chromatin seemed normal although the nucleus was frequently squeezed in between vesicles (Fig. 3a and Additional file 5: Fig. S4b). Eventually, photoreceptor neurons died (Additional file 5: Fig. S4d). Hence, ultrastructural analysis of degenerating photoreceptor neurons indicated that the neurodegeneration induced by BIN1iso1 is characterized by a strong accumulation of single membrane vesicles of unknown origin.

We next evaluated the nature of these vesicles by immunofluorescence using specific organelle GFP- or YFP-tagged markers for endoplasmic reticulum, Golgi, plasma membrane, early endosome, late endosome/multivesicular body, recycling endosome, lysosome and autophagosome [16] (Fig. 3b and Additional file 6: Fig. S5). In 15-day-old flies, many BIN1iso1-induced vesicles were positive for EYFP:Rab5 and GFP:2xFYVE, markers of early endosome and for EYFP:Rab7 and evi:GFP, markers of late endosome/multivesicular body (Fig. 3c, d). These different markers labelled small- to middle-sized vesicles with the exception of evi:GFP which tended to label bigger vesicles. Some big vesicles were

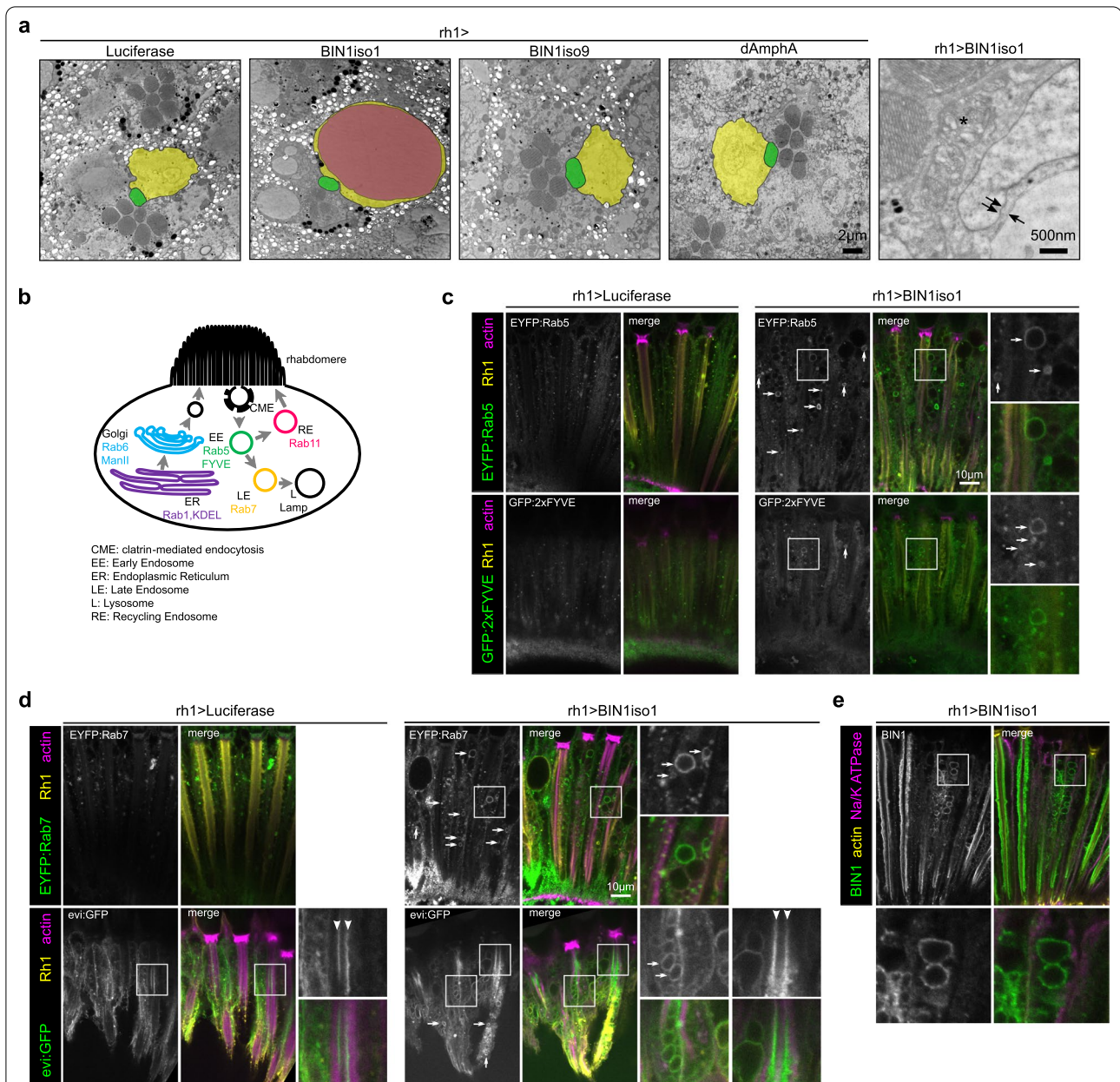
(See figure on next page.)

**Fig. 2** Human BIN1iso1 is neurotoxic in *Drosophila* photoreceptor neurons. **a** Visualization of retina photoreceptor neurons expressing BIN1 isoforms (rh1 promoter) by cornea neutralization in living flies. **b** Quantification (Kruskal Wallis  $p=0.013$  followed by Mann–Whitney comparison,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ ). At the bottom of the graph, upper numbers indicate the number of quantified eyes per condition and lower numbers indicate the mean number of ommatidia quantified per eye. Contrary to BIN1iso8 and BIN1iso9, BIN1iso1 expression induced a progressive age-dependent neurodegeneration, which was not dose-dependent. **c, d** Western blot analysis of BIN1 isoforms expression in the retina and quantification ( $n=3$ , ANOVA  $F\text{-value}=12.98$ ,  $Df=5$ ,  $p=0.00017$ , with post-hoc Tukey,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ). **e** Quantification of BIN1iso1-induced photoreceptor neuron degeneration over 4 weeks under a 12 h/12 h light/dark cycle (Ctrl L and BIN1iso1 L) or under constant darkness (Ctrl D and BIN1iso1 D) (Kruskal Wallis  $p=0.0005344$  for Day8–11,  $p=3.264 \times 10^{-05}$  for Day15–16,  $p=1.36 \times 10^{-07}$  for Day28–29, followed by Mann–Whitney comparison,  $*p<0.05$ ,  $**p<0.01$ ,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.0001$ ). Loss of light did not prevent neurodegeneration although the intensity of degeneration was reduced. **f** Localization of BIN1 isoforms in one-day-old fly photoreceptor neurons. Luciferase was used as a control. Na/K ATPase staining labelled the plasma membrane and actin staining mostly labelled rhabdomere of photoreceptor neurons. Upper panels are longitudinal views of retina, whereas lower panels exhibit sectional views of ommatidium. **g, h** Scheme of the truncated BIN1iso1 tested protein and quantification of their toxicity in 15 day-old flies (Kruskal Wallis  $p=5.686 \times 10^{-11}$  followed by Mann–Whitney comparison,  $***p<0.001$ ,  $****p<0.00001$ ). Loss of the CLAP domain totally abrogated BIN1iso1 toxicity



**Fig. 2** (See legend on previous page.)





**Fig. 3** BIN1 iso1-induced degeneration is characterized by a strong accumulation of vesicles showing endosomal markers. **a** Electron microscopy images of retina expressing Luciferase (Ctrl), AmphA, BIN1 iso1 and BIN1 iso9 from 15-day-old flies. 1 to 2 ommatidia transversal sections are seen on the 4 left images. One photoreceptor neuron is outlined per image, its cytoplasm and nucleus being highlighted in yellow and its rhabdomere in green. Each ommatidium contains 6 outer photoreceptor neurons whose rhabdomeres are organized in a trapezoidal shape, with a 7th rhabdomere in the middle corresponding to one of the two inner photoreceptor neurons. In the BIN1 iso1 condition, only 4 rhabdomeres can be seen. In addition, the cytoplasm of the photoreceptor is filled with vesicles, some of them (highlighted in magenta) are very big. These vesicles are surrounded by a single membrane (arrow on the right panel) as compared to the nuclear envelope (double arrow). Their rhabdomere is usually disintegrating (\*). **b** Scheme of the organelles tested in photoreceptor neurons with the markers used. **c, d** Images of photoreceptor neurons expressing BIN1 iso1 and EYFP-tagged endogenous Rab5 and GFP:2xFYVE, as early endosome markers (**c**), or EYFP-tagged endogenous Rab7 and evi:GFP, as late endosome/multivesicular body markers (**d**). Rh1 and actin staining, respectively yellow and magenta in the merge image, are used to label retina structure of 15-day-old flies. The photoreceptor neurons expressed Luciferase as a control or BIN1 iso1. In the BIN1 iso1 conditions, many vesicles were positive for the tested organelle markers (arrows, green staining in merge images). The extracellular inter-rhabdomeric staining for the evi:GFP marker (arrowhead) corresponds to exosomes. **e** Images of photoreceptor neurons expressing BIN1 iso1 stained for BIN1, the photoreceptor neuron plasma membrane Na/K ATPase and actin in 7-day-old flies. BIN1 iso1 is localized at the base of the rhabdomeres and around some abnormal vesicles as seen in the inset

also exceptionally labelled by the lysosomal Lamp2:GFP marker and corresponded to rare multilamellar bodies observed by electron microscopy (Additional file 5: Fig. S4c and Additional file 6: Fig. S5g). Of note, we also noticed that the extracellular space between rhabdomeres of the 8 photoreceptor neurons in the middle of ommatidia, called the interrhabdomeric space, was positive for evi:GFP in both the control and BIN1iso1 conditions (arrowhead Fig. 3d). Since evi:GFP labels exosomes either within the multivesicular bodies or in the extracellular environment [3, 36], evi:GFP interrhabdomeric staining likely corresponded to released exosome which did not appear to be compromised by BIN1iso1 expression. In addition, we observed staining for BIN1 around some vesicles suggesting a potential direct action of BIN1iso1 on the membrane dynamics of these vesicles (Fig. 3e). In conclusion, these results suggested that BIN1iso1-induced vesicles accumulation originated from a blockade at the level of early endosome and/or late endosome.

#### BIN1iso1 induces neurodegeneration through blockade of the early endosome trafficking in drosophila photoreceptor neurons

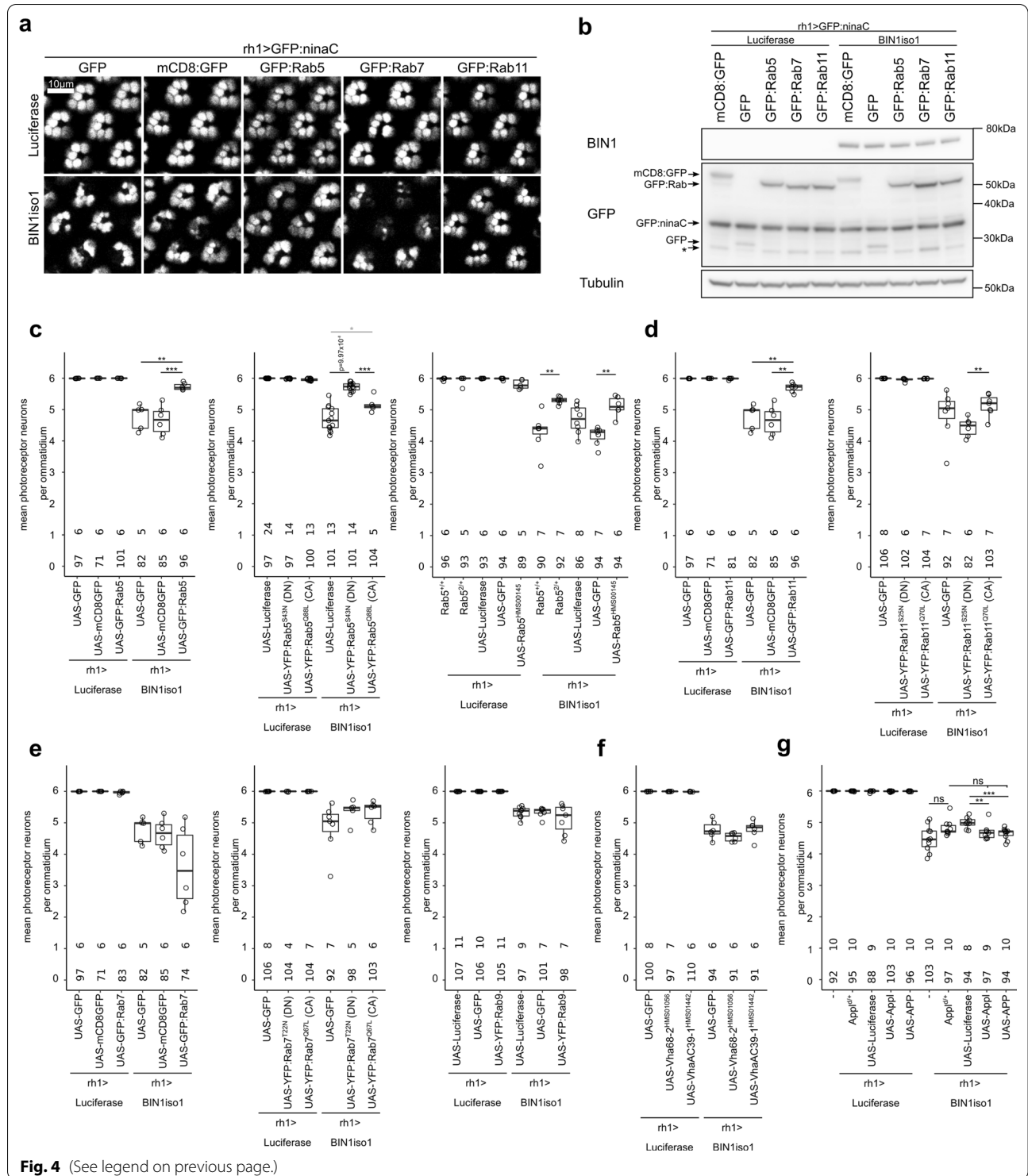
To test if the intracellular trafficking defects were responsible for the neurodegeneration phenotype, we tested if regulators of endosome trafficking could rescue BIN1iso1-induced neurodegeneration. We tested regulator of early endosome (Rab5), recycling endosome (Rab11), late endosome (Rab7 and Rab9) and lysosome (subunits of the V-ATPase) (mostly a collection of UAS transgenes expressing wild-type, constitutively active and dominant negative Rab proteins [68]). We observed an inhibition of BIN1iso1-induced neurotoxicity through a rescue of photoreceptor neurons for regulators of the early endosome Rab5 and recycling endosome Rab11 (Fig. 4a, c, d). Modulation of the late endosome regulators Rab7 and Rab9, and of lysosome V-ATPase did not modify BIN1iso1-induced neuronal loss (Fig. 4e, f). Of note, we checked by western blot that the rescue effect of Rab5 and Rab11 was not due to a decrease in BIN1iso1 expression, consecutive to a dilution of the Gal4 between the multiple UAS

constructs (Fig. 4b). We further tested the constitutively active (CA) and dominant negative (DN) forms of Rab5 and Rab11, respectively named Rab5<sup>CA</sup>, Rab5<sup>DN</sup>, Rab11<sup>CA</sup> and Rab11<sup>DN</sup>. Surprisingly Rab5<sup>DN</sup> rescued BIN1iso1-expressing photoreceptor neurons, whereas Rab5<sup>CA</sup> had no effect (Fig. 4c). This indicated that, although counterintuitive, overexpression of wild-type Rab5 resulted in a loss of function of Rab5 and that loss of function of Rab5 is protective against BIN1iso1-induced neurodegeneration. We confirmed this result when one copy of Rab5 (Rab5<sup>2/+</sup>) was removed or by knocking down Rab5 (Rab5<sup>HMS00145</sup>) (Fig. 4c). Contrary to Rab5, Rab11<sup>DN</sup> increased BIN1iso1-induced neuronal loss (although not significant) (Fig. 4d). A gain of function of Rab11 seemed, therefore, protective against BIN1iso1-induced neurodegeneration. We also tested the fast recycling endosome regulator Rab4 (Additional file 7: Fig. S6). Although one construct expressing mRFP-tagged Rab4 rescued BIN1-induced neurodegeneration, another YFP-tagged Rab4 construct did not, and neither did the YFP-tagged Rab4<sup>DN</sup> or Rab4<sup>CA</sup> construct. Altogether, because the neurodegeneration was rescued by modulation of regulators of early and recycling endosomes, these results indicated that BIN1iso1-induced photoreceptor neuron degeneration is due to a defect in the early endosome trafficking.

We further wondered if BIN1iso1 neurotoxicity may be mediated by APP or one of its metabolites. Indeed, APP- $\beta$  Carboxy Terminal Fragment (APP- $\beta$ CTF), the product of APP cleavage by  $\beta$ -secretase and precursor of A $\beta$  peptide through  $\gamma$ -secretase cleavage, induces endosome enlargement in neurons [28]. Drosophila has a single homolog of APP, called APP Like (Appl), which is also processed by several secretases and generates secreted fragments, a neurotoxic A $\beta$ -like peptide and an C-terminal intracellular domain (AICD) [7]. Interestingly, Appl regulates endolysosomal function in Drosophila neurons [30]. In addition, some results support a regulation of APP processing by BIN1 [62]. We tested if loss of function, overexpression of *Appl* or overexpression of human APP could modulate BIN1iso1-induced photoreceptor neuron degeneration. Loss of one copy of *Appl* had no

(See figure on next page.)

**Fig. 4** BIN1iso1-induced neurodegeneration is rescued by regulators of the intracellular trafficking. **a** Representative images of 15-day-old retina expressing BIN1iso1 or luciferase (as a control) and constructs modulating Rab5, Rab7 and Rab11 activities. **b** Western blot analysis of BIN1, GFP derivatives in the corresponding conditions showing that BIN1 is not decreased in the conditions in which photoreceptor neurons are rescued. \*Non-specific band. **c–g** Quantification of the BIN1iso1-induced neurodegeneration upon respective modulation of the early endosome regulator Rab5 activity, the recycling endosome regulator Rab11 activity, the late endosome regulator Rab7 and Rab9 activities, the lysosomal ATPase activity and Appl/APP. At the bottom of the graph, upper numbers indicate the number of quantified eyes per condition and lower numbers indicate the mean number of ommatidia quantified per eye. Statistical analysis was performed using a Kruskal Wallis test ( $p=0.003643$  for Rab5,  $p=6.169 \times 10^{-06}$  for Rab5<sup>DN</sup> and Rab5<sup>CA</sup>,  $p=0.0001721$  for Rab5 mutant and knockdown,  $p=0.003643$  for Rab11,  $p=0.03487$  for Rab11<sup>DN</sup> and Rab11<sup>CA</sup>,  $p=0.1408$  for Rab7,  $p=0.24$  for Rab7<sup>DN</sup> and Rab7<sup>CA</sup>,  $p=0.8959$  for Rab9,  $p=0.1394$  for lysosomal ATPase subunit knockdown,  $p=0.006947$  for Appl/APP) followed by Mann Whitney comparison (\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ )



effect suggesting that *Appl* is not required for BIN1iso1 toxicity (Fig. 4g). Overexpression of *Appl* and human *APP* significantly enhanced PR loss but only slightly in terms of fold change and not significantly compared to the loss of one copy of *Appl* (Fig. 4g). Overall, these experiments suggest that APP (and potentially its metabolites) do not contribute to the BIN1iso1 neurotoxicity observed in our *Drosophila* model.

### Generation and characterization of *BIN1* WT and KO human induced neurons

Next, we wondered whether the role of BIN1iso1 in endosome trafficking was conserved in Human. To address this possibility, we generated human isogenic *BIN1* wild type (WT) and knockout (KO) pluripotent stem cell (hiPSC) lines by CRISPR/Cas9 technology. Both hiPSC lines showed similar expression of pluripotency cell markers (SOX2 and SSEA4, Fig. 5c) and growth rates (Fig. 5d). *BIN1* WT hiPSC expressed low molecular weight BIN1 isoforms, including likely BIN1iso9 (Fig. 5i). We then employed these cells to generate hiPSC-derived neurons both in bi-dimensional (2D) cell cultures and in cerebral organoids.

Following neural induction, both *BIN1* WT and KO human induced neural progenitor cells (hiNPCs) expressed similar levels of NESTIN and SOX2 (Fig. 5e). Although *BIN1* KO hiNPCs showed a significant reduction in growth rate when compared to WT (Fig. 5f), both hiNPCs lines were expanded up to 10 passages and readily generated similar proportions of human induced neurons (hiNs) and astrocytes (hiAs) when subjected to conditions of differentiation (Fig. 5g, h). WT hiNPCs mainly expressed low molecular weight BIN1 isoforms, whereas in differentiated cultures both low and high molecular weight isoforms, probably corresponding to BIN1iso9 and BIN1iso1 respectively, were expressed (Fig. 5j). The expression pattern observed for BIN1

isoforms likely reflects the mixed composition of the differentiated cell cultures at 6 weeks, comprising both neurons and astrocytes, which mainly express BIN1iso1 and BIN1iso9, respectively [69].

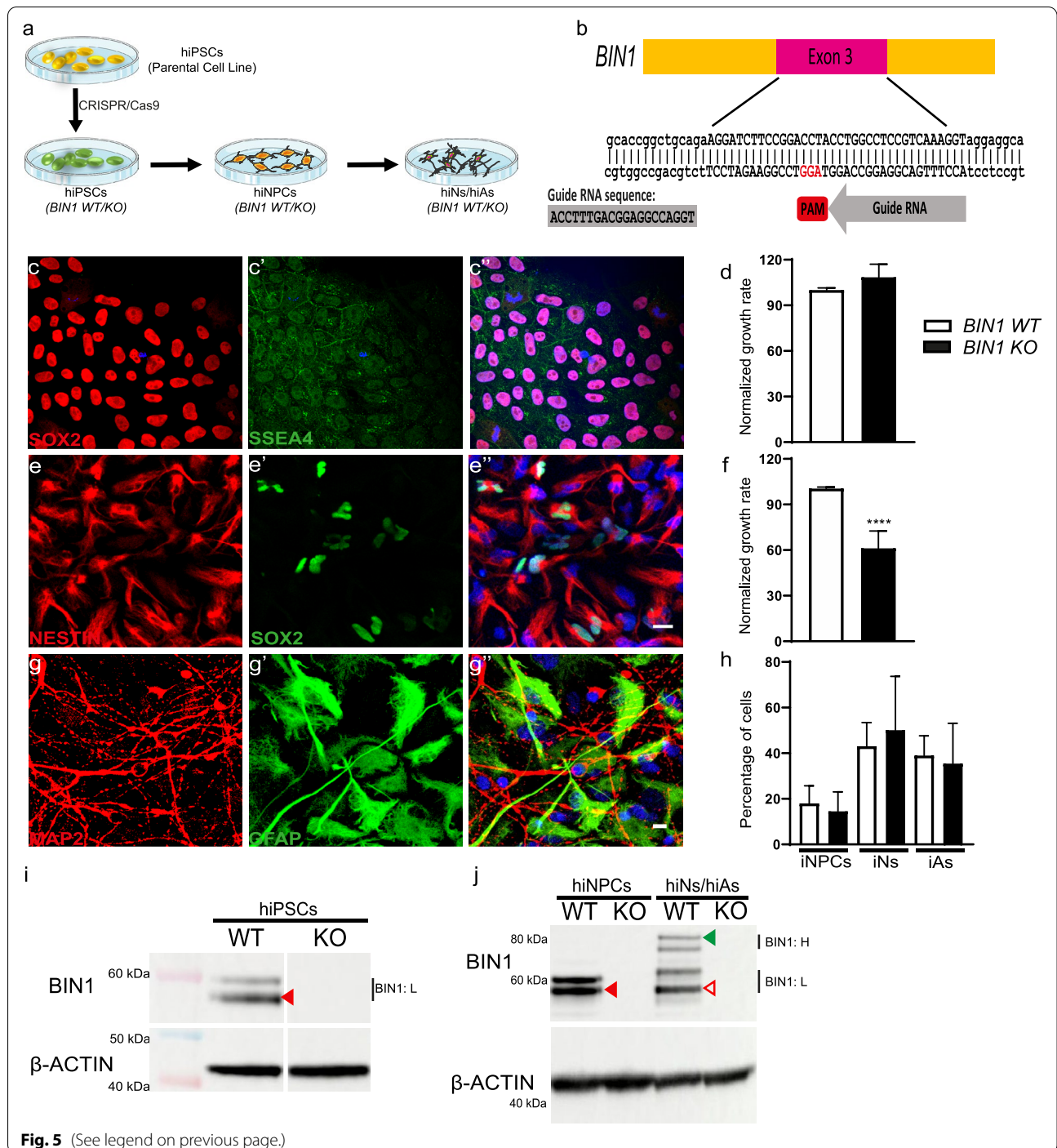
Likewise, *BIN1* WT and KO hiPSCs were able to generate cerebral organoids with no obvious differences in size and composition (Fig. 6a, b). Expression of BIN1 protein in 190-day-old *BIN1* WT cerebral organoids was confirmed by western blot and showed a similar pattern as the one described in 2D cell cultures (Fig. 6c). Next, using single-nucleus RNA-sequencing (snRNA-seq), we observed that cerebral organoids of both genotypes contain all major neural cell types, with no significant difference in the proportions of cell types (Fig. 6d, e, f and Additional file 8: Fig. S7). We then performed differential gene expression analysis for all different cell types identified in *BIN1* WT and KO cerebral organoids using DESeq2 [38]. We observed 41 differentially expressed genes (DEGs;  $0.7 < FC < 1.3$  and  $FDR < 0.01$ ) in glutamatergic neurons and 43 DEGs in astrocytes (Fig. 6g, h and Additional file 9: Table S1). All the other cell types showed none or only 1–2 DEGs (Additional file 9: Table S1), indicating that *BIN1* WT and KO neural cells have similar gene expression profiles. Importantly, even for the 41 DEGs observed in glutamatergic neurons, no significant enrichment for gene ontologies associated with endocytic pathway was observed (Additional file 10: Table S2). These findings indicate that *BIN1* WT and KO hiPSC-derived neurons mainly differ by the expression of BIN1. As a consequence, potential defects in the endosome pathway in these cell models are likely not due to major transcriptional modifications but due to a direct action of BIN1 protein and its interaction with other proteins.

APP metabolism and endosome trafficking are tightly interconnected processes [23, 34] and previous work has suggested a role for BIN1 in their regulation [42, 62].

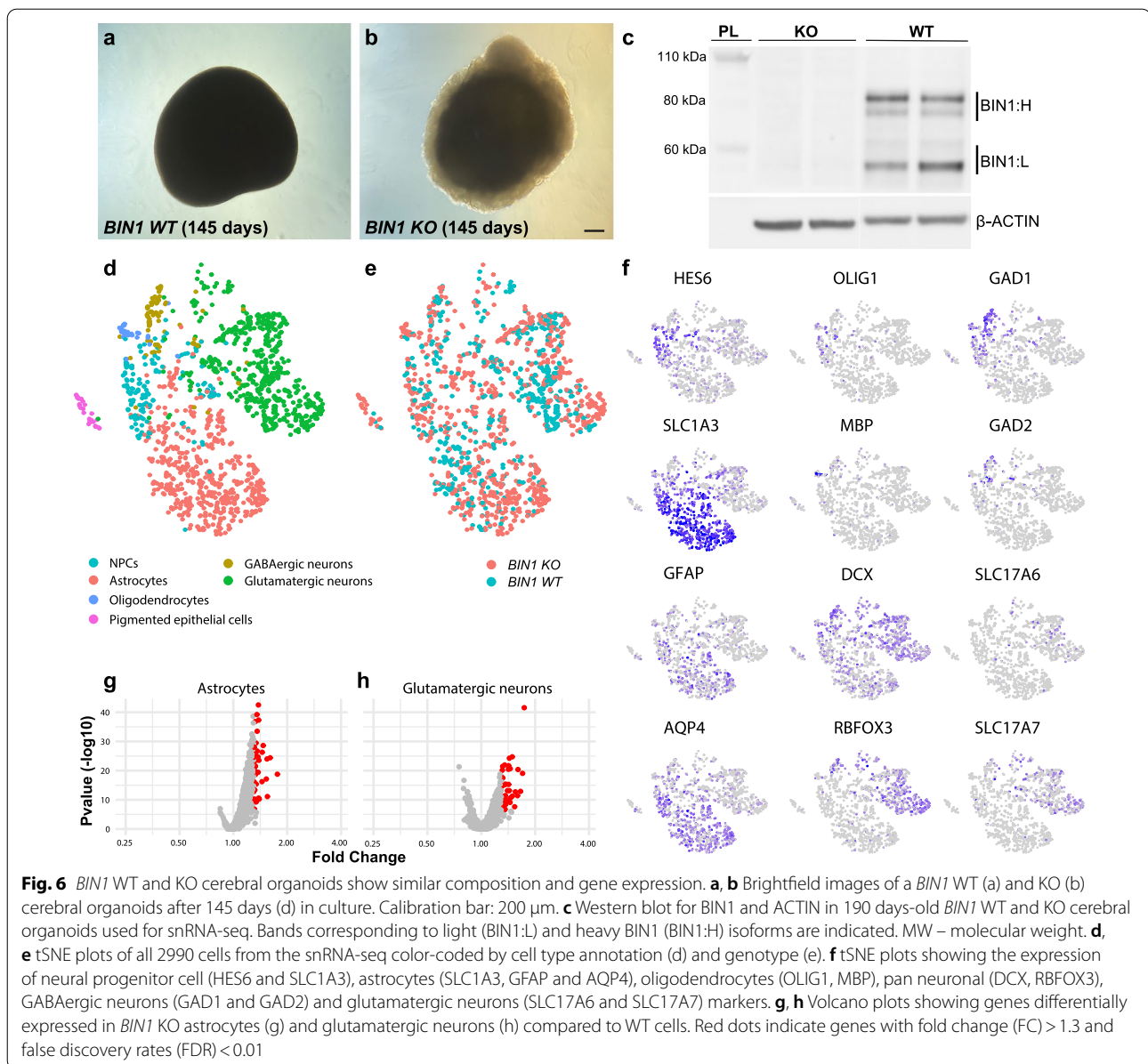
(See figure on next page.)

**Fig. 5** Characterization of hiPSCs and their cell derivatives. **a** Schematic showing the production of *BIN1* WT and KO hiPSCs from parental cell line using CRISPR/Cas9 technology. These hiPSCs, in turn, were used to generate intermediate hiNPCs, and subsequently, mixed cultures of hiNs and hiAs. **b** Representation of exon 3 region of BIN1 was targeted for the production of *BIN1* WT and KO hiPSCs by CRISPR/Cas9 technology. The guide RNA sequence is shown (grey). **c-c'** Representative images showing pluripotency markers SOX2 (red), SSEA4 (green) and stained with Hoechst 33258 (**c'**) in *BIN1* WT and KO hiPSCs. **d** Plot showing the normalized growth rate of *BIN1* WT and KO hiPSCs ( $N = 4$  independent cell passages;  $p = 0.77$ , Unpaired t-test). **e-e'** Representative images showing hiNPCs labelled for NESTIN (red), SOX2 (green) and stained with Hoechst 33258 (**e'**, Scale Bar = 20  $\mu\text{m}$ ). **f** Plot showing the normalized growth rate of *BIN1* WT and KO hiNPCs ( $N = 9$  independent cell passages: \*\*\*\* $p < 0.0001$ , Unpaired t-test). **g-g'** Representative images showing a 6-week-old mixed hiNs/hiAs culture labelled for the neuronal marker MAP2 (red), the astrocytic marker GFAP (green) and stained with Hoechst 33258 (**g'**, Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$ ). **h** Plot showing the percentage of cells in different cell populations – hiNPCs, hiNs, and hiAs (ANOVA  $F_{(5,12)}$ ,  $p = 0.45$ ). **i** Immunoblot for BIN1 and actin in *BIN1* WT and KO hiPSCs samples. Band indicated on the blot for the WT cells (solid red arrowhead) indicates BIN1-light (BIN1:L) isoforms of BIN1. **j** Immunoblot showing the expression of BIN1:L isoforms (solid red arrowhead) in WT hiNPCs and both BIN1:L (hollow red arrowhead) and BIN1-heavy (BIN1:H; solid green arrowhead) isoforms in 6-week-old mixed cultures of hiNs and hiAs





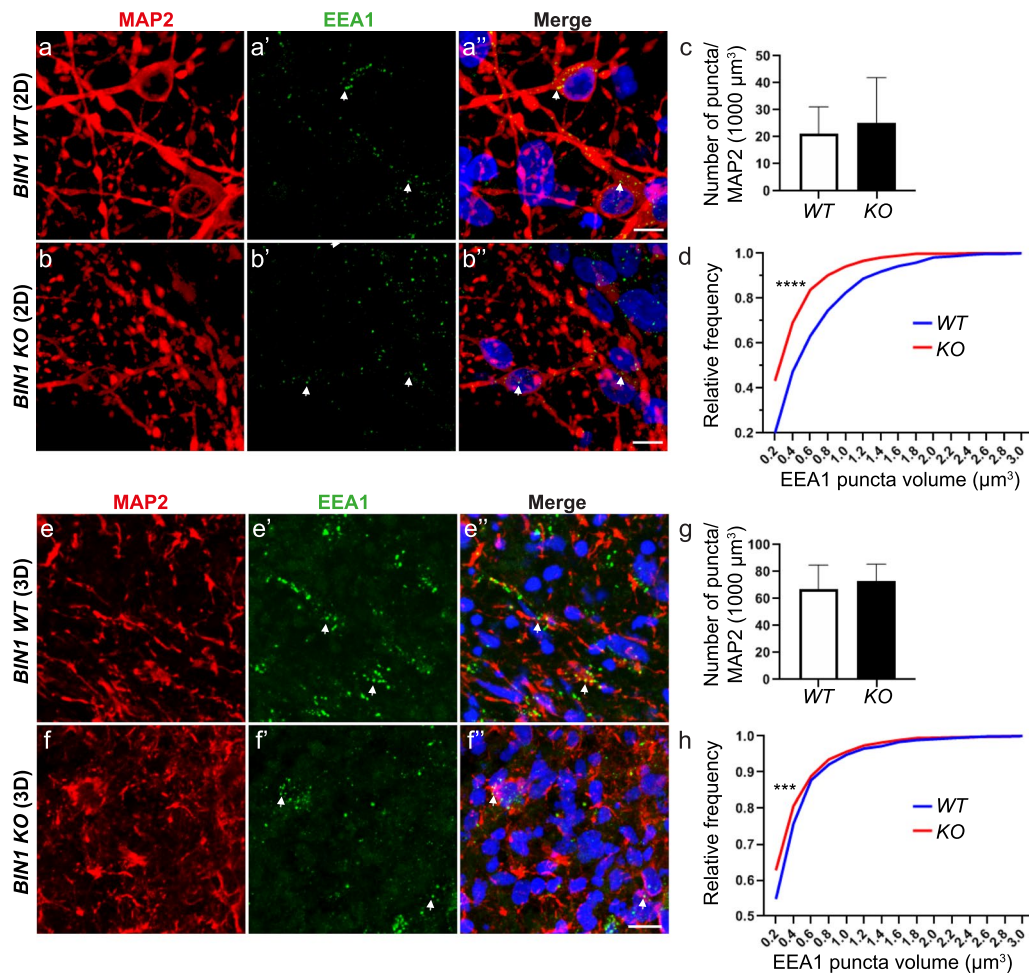




To probe whether *BIN1* deletion could affect amyloidogenic APP processing in hiNs, we measured the levels of the APP  $\beta$ -CTF in cerebral organoids and 2D cell cultures (Additional file 11: Fig. S8). We found a significant reduction in the levels of APP  $\beta$ -CTF normalized either by ACTIN or full-length APP in *BIN1* KO compared to WT cerebral organoids (Additional file 11: Fig. S8a, b). A similar trend was observed in 2D cell cultures, but without reaching statistical significance (Additional file 11: Fig. S8c, d).

#### *BIN1* null mutation is associated with smaller early-endosome vesicles in hiPSC-derived neurons

In order to probe the impact of *BIN1* null mutation in hiNs, we quantified the number and size of the early endosome antigen 1 (EEA1)-expressing endosomes in microtubule-associated protein 2 (MAP2)-expressing cells in both 2D cultures and cerebral organoids (Fig. 7). EEA1 is an early endosomal Rab5 effector protein that has been implicated in the docking of incoming

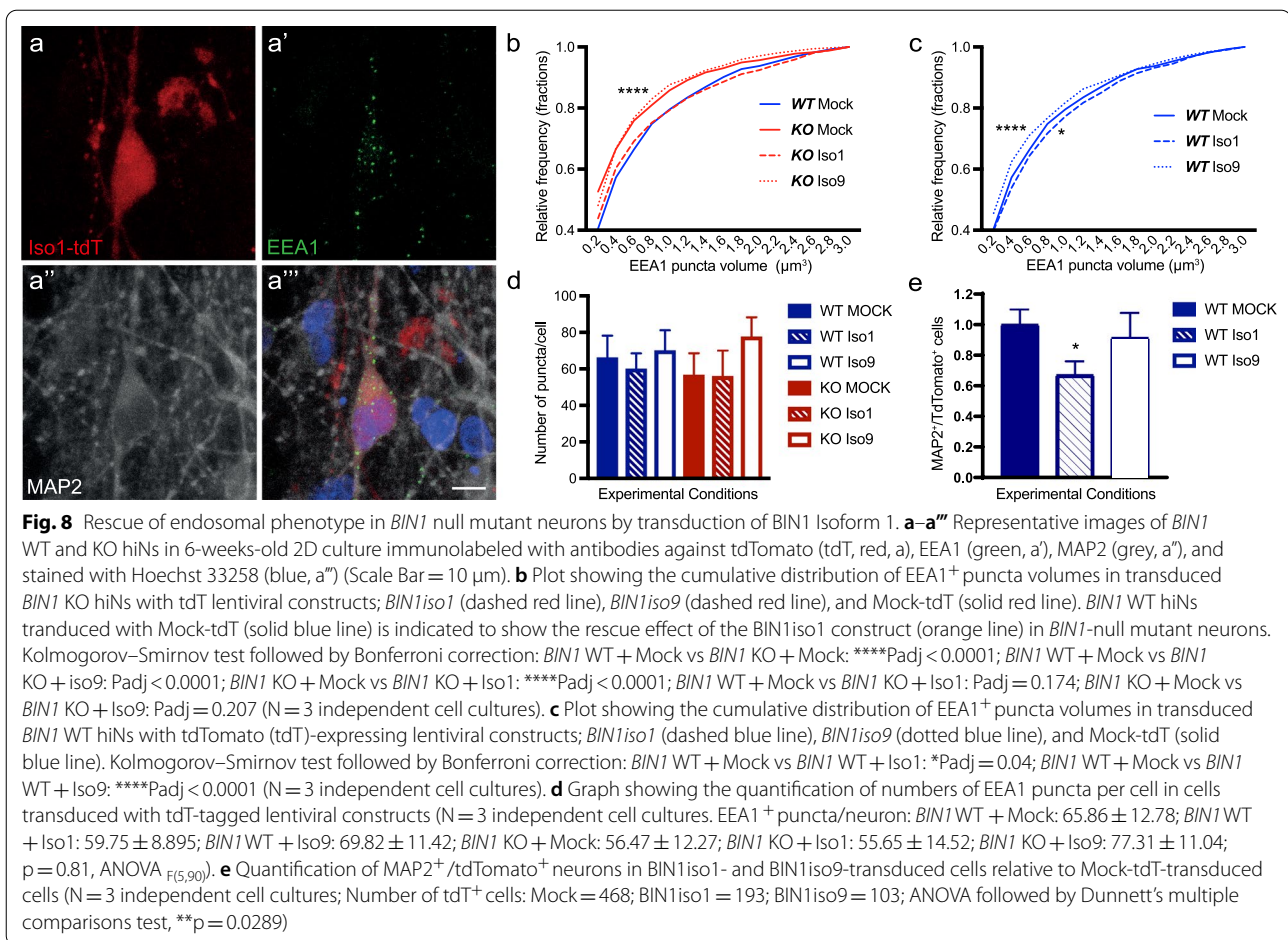


**Fig. 7** Increased proportion of small-volume endosomes in *BIN1* null mutant hiNs. **a–b''** Representative images of *BIN1* WT and KO hiNs in 6-week-old 2D cultures immunolabeled with antibodies against MAP2 (red, a and b) and EEA1 (green, a' and b') and stained with Hoechst 33258 (blue, a'' and b'') (Scale Bar = 10  $\mu\text{m}$ ). **c** Plot showing the quantification of the number of EEA1<sup>+</sup> puncta per 1000  $\mu\text{m}^3$  of MAP2<sup>+</sup> surface (N = 3 independent cell cultures; *BIN1* WT hiNs:  $21.15 \pm 9.94$  EEA1<sup>+</sup> puncta per 1000  $\mu\text{m}^3$  of MAP2<sup>+</sup> surface; *BIN1* KO hiNs:  $25.31 \pm 16.58$  EEA1<sup>+</sup> puncta per 1000  $\mu\text{m}^3$  of MAP2<sup>+</sup> surface;  $p = 0.84$ , Unpaired t-test). **d** Plot showing the cumulative distribution of EEA1<sup>+</sup> puncta volumes in *BIN1* WT (blue line) and KO (red line) hiNs (N = 3 independent cell cultures; Kolmogorov–Smirnov test, \*\*\*\* $p < 0.0001$ ). **e–f''** Coronal sections of 190-days-old *BIN1* WT and KO cerebral organoids immunolabeled with antibodies against MAP2 (red, e and f) and EEA1 (green, e' and f') and stained with Hoechst 33258 (blue, e'' and f''). **g** Quantification of the number of EEA1<sup>+</sup> puncta per 1000  $\mu\text{m}^3$  of MAP2<sup>+</sup> surface (N = 3 organoids per genotype; cerebral organoids: *BIN1* WT hiNs:  $66.72 \pm 18.13$  EEA1<sup>+</sup> puncta per 1000  $\mu\text{m}^3$  of MAP2<sup>+</sup> surface; *BIN1* KO hiNs:  $73.18 \pm 12.47$  EEA1<sup>+</sup> puncta per 1000  $\mu\text{m}^3$  of MAP2<sup>+</sup> surface; Unpaired t-test,  $p = 0.96$ ). **h** Cumulative distribution of EEA1<sup>+</sup> puncta volumes in *BIN1* WT (blue line) and KO (red line) hiNs (N = 3 organoids per genotype; Kolmogorov–Smirnov test, \*\*\* $p < 0.001$ )

endocytic vesicles before fusion with early endosomes [43]. We observed a significant change in the cumulative distribution of EEA1<sup>+</sup> endosome volumes in hiNs both in 2D cultures and cerebral organoids, mostly due to a predominance of small volume endosomes in *BIN1* KO compared to WT hiNs (Fig. 7d, h). Conversely, no significant change in the number of endosomes was observed in hiNs of both genotypes (Fig. 7c, g). These data suggested that BIN1 is involved in the regulation of early endosome size in human neurons.

### **BIN1iso1 specifically modulates sizes of the early-endosome vesicles**

We then wondered whether the function of BIN1 in endocytosis could also be isoform-specific in human neurons, as observed in *Drosophila*. To test this possibility, we set out to perform lentiviral-mediated transfection with fluorophore-expressing BIN1iso1, BIN1iso9 or control plasmids in hiNs at 3 weeks of differentiation. After 3 additional weeks, we quantified the number and size of EEA1-expressing endosomes in transfected hiNs



identified by tdTomato expression (Fig. 8). We observed that expression of BIN1iso1, but not BIN1iso9, in *BIN1* KO hiNs fully rescued the volume of EEA1<sup>+</sup> endosomes to values similar of those observed in WT hiNs (Fig. 8b). We also over-expressed BIN1iso1 and BIN1iso9 in WT hiNs. Consistent with our previous observation in flies, we observed that BIN1iso1 overexpression in neurons led to an increase of large volumes EEA1<sup>+</sup> endosomes, whereas the opposite effect was observed in neurons overexpressing BIN1iso9 (Fig. 8c). Neither in *BIN1* WT nor in KO hiNs did we observe significant changes in the number of puncta per cell after BIN1iso1 or BIN1iso9 overexpression (Fig. 8d). Lastly, we evaluated whether BIN1iso1 overexpression could have a neurotoxic effect in hiNs. To that end, we quantified the proportion of MAP2<sup>+</sup> neurons in 6 weeks cultures after transduction with BIN1iso1-, BIN1iso9- or control-tdTomato<sup>+</sup> cells. We found that BIN1iso1 overexpression led to a 30% reduction in the proportion of neurons compared to controls (Fig. 8e). Interestingly, this effect of BIN1iso1 was not observed in *BIN1* KO cells, suggesting that only

supra-physiological expression levels of this isoform could be toxic for neurons.

Altogether, these observations indicate that BIN1iso1 expression is sufficient to regulate endosome volumes, even in the absence of other BIN1 isoforms in *BIN1* KO hiNs, and that increased expression of BIN1iso1 deregulates endosome size and can lead to degeneration of human neurons, as observed in *Drosophila* photoreceptors.

## Discussion

In this work, we assessed the function and potential neurotoxicity of human BIN1 isoforms in *Drosophila* and human neurons. We show a functional conservation of human BIN1 in *Drosophila* as BIN1iso1, BIN1iso8 and BIN1iso9 phenocopied dAmphA-induced photoreceptor neuron developmental defects and BIN1iso8 was able to rescue the locomotor defects associated with the loss of *dAmph* in *Drosophila*. Expression of BIN1iso1 resulted in a progressive neurodegeneration of photoreceptor neurons that was isoform-specific and dose-independent.



The degeneration did not depend on the activation of the phototransduction cascade and was associated with a strong accumulation of vesicles harboring early and late endosomal markers. These results suggested that a BIN1 isoform-specific alteration of the endosome-lysosome pathway could contribute to neuronal degeneration. Accordingly, the degeneration was prevented by a loss of function of the early endosome regulator Rab5 and a gain of function of the recycling endosomal protein Rab11. Lastly, we observed a conservation of BIN1iso1 function in hiNs in 2D cultures and in organoids. Loss of BIN1 resulted in reduced size of early endosomes, whereas expression of BIN1iso1, but not BIN1iso9, was able to rescue the reduced size of early endosomes in the *BIN1* KO hiNs. As in *Drosophila*, overexpression of BIN1iso1 resulted in enlarged early endosomes and had neurotoxic effects in WT hiNs.

Our results indicate context- and isoform-specific functions of BIN1: (i) Expression of BIN1iso1, BIN1iso8 and BIN1iso9 altered photoreceptor neuron rhabdomere morphogenesis during development in an isoform-independent and dose-dependent manner, whereas in the adult photoreceptor neurons BIN1iso1 expression induced neurodegeneration in an isoform-dependent and dose-independent manner; (ii) in human neurons, we observed a shift in BIN1 isoform expression from low molecular weight isoforms in hiPSCs and NPCs (likely mainly BIN1iso9) to high molecular weight isoforms in hiNs (likely mainly BIN1iso1); (iii) BIN1iso1 expression rescued the size of BIN1-deficient early endosomes contrary to BIN1iso9. Collectively, these results argue for an important role of BIN1iso1 in mature neuronal cells and support the fact that BIN1iso1 is a neuron-specific isoform with specific functions in this cell-type [52, 69]. Furthermore, (i) *BIN1* KO hiNs showed early endosomes of reduced size; (ii) in *BIN1* KO hiNs, BIN1iso1 expression rescued early endosome sizes but did not lead to enlargement of these vesicles; and (iii) in WT hiNs, BIN1iso1 overexpression induced early endosome enlargement. These results suggest that homeostatic BIN1iso1 expression levels need to be tightly regulated to allow proper endocytic trafficking in neurons. Of note, BIN1iso9 overexpression in WT hiNs induced a reduction of early endosome size. Since BIN1 forms dimers through its BAR domain [51], we postulate that BIN1iso9 may dimerize with BIN1iso1 and inhibit BIN1iso1 function in a dominant negative manner. Interestingly, this may also indicate another level of complexity to regulate BIN1 functions at the protein level.

Our results support a direct role of BIN1iso1 in neurons at the early endosome crossroad as indicated (i) by the labeling of large vesicles with early endosome markers

in *Drosophila*, (ii) by the Rab5 rescue experiment in *Drosophila* and (iii) by the early endosome size modulation in hiNs. Of note, the phenotype with very large vesicles in *Drosophila* likely results from *Drosophila* being a heterologous system for human BIN1iso1, and as a consequence, exhibiting stronger phenotypes. Additionally, in *Drosophila*, some of the vesicles also exhibited markers for late endosome/MVB and exceptionally, lysosome. However, regulation of late endosome/MVB or lysosomal function did not modulate photoreceptor degeneration and secretion of exosomes did not appear to be blocked, suggesting that BIN1iso1 defect do not occur at this level. BIN1 has been proposed to regulate endocytosis by interaction with clathrin, Adaptor Proteins (AP) and dynamins [12, 22, 26, 50, 65]. Since some of these proteins are also involved in vesicle budding of the intracellular organelles [26], we propose that BIN1iso1 may also inhibit vesicle budding of early endosomes, thus, leading to an increase in their size. Overexpressing Rab11 would overcome this inhibition through the activation of endosome recycling, decompress enlarged endosomes and explain the rescuing effect of a gain of Rab11 that we observed. In support of this direct action of BIN1iso1 on endosomes, (i) we observed BIN1iso1 on the large endosomal vesicles in *Drosophila*, (ii) BIN1 knockout in cerebral organoids reduced endosome size without impacting expression of genes involved in the endosome trafficking pathway, and (iii) in *Drosophila*, BIN1iso1 toxicity was dependent on the CLAP domain, which is known to directly bind intracellular trafficking proteins like clathrin and APs [50]. This regulation of early endosomes correlates with a broader role of BIN1 in the regulation of intracellular trafficking ranging from endocytosis [6, 65] to recycling endosomes [62] as well as related processes in neuronal pre- or post-synaptic compartments [53, 56].

Interestingly, a growing body of evidence supports a dysregulation of the endosomal-lysosomal system as a plausible underlying mechanism in AD pathogenesis [45, 58]. Several AD susceptibility genes identified by GWAS (*BIN1*, *PICALM*, *EPHA1*, *CD2AP*, *SORL1* and *RIN3*) encode proteins that function predominantly in endocytic trafficking [15]. Endosome enlargement has been described to be the first cytopathological marker of AD, before the emergence of plaques and tangles [8]. Several human AD cell models, namely hiNs originating from sporadic and familial AD patients [27], hiNs carrying fAD APP and PSEN1 mutations [34] and hiNs knocked-out for the AD risk gene *SORL1* [25, 32], recapitulate these endosomal defects similarly to what we observed in the BIN1iso1 overexpressing hiNs. In AD and Down syndrome, these defects are associated with an overactivation of Rab5 [47] and overactivation of Rab5 in mice mimics AD-like endosomal dysfunction [48]. We have

also shown that BIN1iso1 effects in *Drosophila* are Rab5-dependent. Early endosomes are a major site of APP processing by  $\beta$ -secretase to yield APP  $\beta$ -CTF. Therefore, alterations in endocytic pathways can affect APP metabolism and this likely explain the decrease in APP  $\beta$ -CTF we observed in the BIN1 knocked-out hiNs. Reciprocally, APP  $\beta$ -CTF mediates endosomal defects in fAD mutant hiNs [34]. To do so, APP  $\beta$ -CTF activates Rab5 via APPL1 [31]. However, in our study, loss of *Appl*, the *Drosophila* ortholog of APP, did not rescue BIN1iso1-induced neurodegeneration, suggesting that APP  $\beta$ -CTF does not mediate BIN1iso1 toxicity. The involvement of APP  $\beta$ -CTF have also been questioned in SORL1 knocked-out hiNs with contradictory results in two studies showing APP  $\beta$ -CTF-dependent or -independent endosomal defects [25, 32]. Another putative intermediate is Ras and Rab Interactor 3 (RIN3), a guanine nucleotide exchange factor (GEF) for the Rab5 small GTPase family, which is located in a GWAS-defined AD susceptibility locus [35]. Upregulation of RIN3 induces endosomal dysfunction through Rab5 [57] and RIN3 interacts with BIN1 [29, 57]. Further experiments would be, thus, of interest to test RIN3 as an intermediate for BIN1iso1 neurotoxicity. Finally, we show that BIN1iso1 endosomal defects and toxicity can be attenuated by a gain of function of Rab11, which dovetails with data showing a colocalization of BIN1 with Rab11 [56] and indicating that Rab11 activity is altered in AD in relationship with endosomal trafficking [5, 63, 66]. Overall, our results strongly support a role of BIN1 in the endosomal dysregulation observed in AD.

Since we observed endosome enlargement and neurodegeneration upon BIN1iso1 overexpression, our results also suggest that an increase in BIN1iso1 may be deleterious to neurons and contribute to early phases of AD pathology through early endosome alterations. It implies an increase in BIN1iso1 levels in neurons, which remains elusive. To date, most experiments showing altered BIN1 expression in the AD brain have focused in samples obtained at late stages of the pathology [1, 9, 21, 24, 41, 52, 60] and none have directly measured the levels of BIN1 isoforms at early stages of the pathology at the single-cell resolution. Therefore, at this point, it is not possible to establish a clear link between levels of BIN1 expression in neurons and AD pathogenesis. Due to the numerous biological roles of BIN1 in AD pathophysiology, it is parsimonious to envisage that both up- and down-regulation of BIN1 isoforms expression in the human brain could affect disease progression through different cell-type specific mechanisms, including the endosomal abnormalities described here.

Future studies should also address the possibility that *BIN1* polymorphisms associated with an increased AD

risk could affect the expression of BIN1iso1 in neurons. Interestingly, the variant rs59335482, an insertion allele associated with a higher AD risk, is able to increase transcriptional activity in a luciferase assay in vitro using HEK cells and SH-SY5Y neuroblastoma cells, and is also associated with an increase in *BIN1* mRNA expression in the brain [9]. However, individual BIN1 isoforms were not analyzed in this study. Other variants, rs6733839 and rs13025717, in linkage disequilibrium with the above-mentioned variant, have been shown to be located in a region enriched in microglia-specific enhancers [10, 46]. Deletion of a large 363 bp promoter region containing these variants in hiPSCs resulted in a decrease of *BIN1* expression specifically in human induced microglia, but not in Neurog2-induced hiNs. Unfortunately, neither the transcriptional effect of the exact variants nor the expression of BIN1 in spontaneously differentiated hiNs have been tested yet. In addition, the possibility that the impact of functional variants may depend on specific AD pathophysiological process, e.g. A $\beta$  exposure, has not been assessed. There is, thus, a high uncertainty about functional variants in the BIN1 locus. Even if our current study was not intended to directly assess functional consequences of AD risk-related BIN1 polymorphisms but to focus on BIN1 isoforms function in neurons, which are still insufficiently described and understood, it may provide a context for BIN1-associated risk, namely the dysregulation of early endosome size and function. Up to now and not exclusive from each other, BIN1 polymorphisms have been associated with Tau but not amyloid loads in post-mortem AD brain tissue [9] and they are consistently associated with faster A $\beta$ -associated Tau-PET accumulation and cognitive decline in AD patient [18, 19].

## Conclusions

In conclusion, an increase of BIN1iso1 in neurons could contribute to AD pathogenesis by increasing the size of early endosomes observed early in the pathogenic process and by inducing neurodegeneration. Other AD genetic determinants have also been shown to regulate early endosome size, supporting early endosome defects as a major event in the pathogenesis of AD.

## Abbreviations

A $\beta$ : Amyloid  $\beta$  peptide; AD: Alzheimer's disease; APP  $\beta$ -CTF: APP  $\beta$ -carboxy terminal fragment; BAR: BIN1/Amphiphysin/RVS; BIN1iso1: Human BIN1 isoform1; BIN1iso8: Human BIN1 isoform8; BIN1iso9: Human BIN1 isoform9; CA: Constitutively active; CLAP: Clathrin and adaptor protein-2 binding; DEG: Differentially expressed genes; DN: Dominant negative; hiA: Human induced astrocyte; hiN: Human induced neuron; hiNPC: Human induced neural progenitor cells; hiPSC: Human induced pluripotent stem cells; KO: Knockout; snRNA-seq: Single-nucleus RNA-sequencing; WT: Wild type.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01285-5>.

**Additional file 1.** Supplementary information and supplementary methods.

**Additional file 2.** Figure S1. Creation of transgenic lines expressing human BIN1 isoforms.

**Additional file 3.** Figure S2. Scheme of AmphMI08903-TG4.0 allele.

**Additional file 4.** Figure S3. Generation and test of transgenic *Drosophila* expressing truncated human BIN1-1 forms for the Exon7 (BIN1-1  $\Delta$ Ex7) and the CLAP domain (BIN1-1  $\Delta$ CLAP).

**Additional file 5.** Figure S4. Electron microscopy images of BIN1-1-induced photoreceptor degeneration in *Drosophila* eyes.

**Additional file 6.** Figure S5. Screening of organelle markers in BIN1-1-induced degenerating photoreceptor neurons.

**Additional file 7.** Figure S6. Effect of Rab4 modulation on BIN1 iso1 neurotoxicity in *Drosophila* photoreceptor neurons.

**Additional file 8.** Figure S7. Graphic representation of proportions of cell types (in percentages) in *BIN1* KO and WT cerebral organoids.

**Additional file 9.** Table S1. Differential gene expression analysis for all different cell types identified in *BIN1* WT and KO cerebral organoids.

**Additional file 10.** Table S2. Gene ontology enrichment analysis for the 41 DEGs observed in glutamatergic neurons.

**Additional file 11.** Figure S8. Decreased APP/ $\beta$ -CTF levels in *BIN1* KO cerebral organoids.

## Acknowledgements

The authors thank the BICeL platform of the Institut Biologie de Lille and the Vect'UB viral platform (INSERM US 005 – CNRS 3427 – TBMCore, Université de Bordeaux, France). The authors also thank the UMR 8199 LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France). We thank A. Zehhof, G.L. Boulianne and J Laporte for antibody, fly stock and cDNA. The a5 and 4C5 antibodies developed by Fambrough, D.M. (The Johns Hopkins University) and de Couet, H.G./Tanimura, T. (University of Hawaii) were obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the NICHD of the NIH and maintained at The University of Iowa, Department of Biology, Iowa City, IA 52242.

## Authors' contributions

Conceptualization, PD, MRC, JCL, BD; Methodology, PD, MRC, XH; Investigation, PD, EL, MRC, OS, NB, XH, FA, BSL, ARMF, J G, AC, AP, FD; Resources, XH, LD, CD, JC, AB; Writing—Original Draft, PD, MRC, JCL, EL, OS; Writing—Reviews & Editing, PD, MRC, JCL, EL, OS; Supervision, PD, JCL, MRC, FD, BD, PA, FL, PV; Funding Acquisition, JCL, MRC, PD, BD. All authors read and approved the final manuscript.

## Funding

*Drosophila* cDNA was obtained from the *Drosophila* Genomics Resource Center, supported by NIH Grant 2P40OD010949. *Drosophila* stocks obtained from the Bloomington *Drosophila* Stock Center (NIH P40OD018537) were used in this study. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) Project was supported by the Common Fund of the Office of the Director of the National Institutes of Health, and by NCI, NHGRI, NHLBI, NIDA, NIMH, and NINDS. The data used for the analyses described in this manuscript were obtained from dbGaP accession number phs000424.v8.p2 on 04/02/2021. This work was supported by France Alzheimer (#328 Adhesion, #1999 BIN1DROSO), Fondation Vaincre Alzheimer (LECMA Grant The BIN1-Tau neurotoxic link in *Drosophila*) and la Fondation pour la recherche médicale (ALZ201912009628, ALZ201906008477). This work was co-funded by the European Union under the European Regional Development Fund (ERDF) and by the Hauts de France Regional Council (Contrat No.18006176), the MEL (contract\_2016\_ESR\_05), and the French State (contract no. 2018-3-CTRL\_IPL\_Phase2). This work was also funded by the Lille Métropole Communauté Urbaine and the French government's LABEX DISTALZ program (Development of innovative strategies

for a transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). The UMR 8199 LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France) belongs to the 'Federation de Recherche' 3508 Labex EGID (European Genomics Institute for Diabetes; ANR-10-LABX-46) and was supported by the ANR Equipex 2010 session (ANR-10-EQPX-07-01; 'LIGAN-PM'). The LIGAN-PM Genomics platform (Lille, France) is also supported by the FEDER and the Region Nord-Pas-de-Calais-Picardie.

## Availability of data and materials

The datasets analyzed during the current study are available from corresponding authors on reasonable request.

## Declarations

### Competing interests

The authors declare no competing interests.

### Author details

<sup>1</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur Lille, U1167 - RID-AGE - Facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, F-59000 Lille, France. <sup>2</sup>Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil. <sup>3</sup>Univ. Lille, Inserm, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1283-UMR 8199 EGID, F-59000 Lille, France. <sup>4</sup>Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-CIL- Center for Infection and Immunity of Lille, F-59000 Lille, France. <sup>5</sup>VIB Center for Brain and Disease Research, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>6</sup>Department of Neurosciences, Leuven Brain Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium. <sup>7</sup>Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41-UMS2014-PLBS, F-59000 Lille, France. <sup>8</sup>Department of Biomolecular Medicine, Faculty of Medicine and Health sciences, Ghent University, 9000 Ghent, Belgium. <sup>9</sup>Centre for Medical Genetics, Ghent University Hospital, 9000 Ghent, Belgium.

Received: 20 October 2021 Accepted: 23 October 2021

Published online: 08 January 2022

## References

- Adams SL, Tilton K, Kozubek JA, Seshadri S, Delalle I (2016) Subcellular changes in bridging integrator 1 protein expression in the cerebral cortex during the progression of Alzheimer disease pathology. *J Neuropathol Exp Neurol* 75:779–790. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlw056>
- Andrew RJ, De Rossi P, Nguyen P, Kowalski HR, Recupero AJ, Guerbet T et al (2019) Reduction of the expression of the late-onset Alzheimer's disease (AD) risk-factor *BIN1* does not affect amyloid pathology in an AD mouse model. *J Biol Chem* 294:4477–4487. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.006379>
- Bartscherer K, Pelte N, Ingelfinger D, Boutros M (2006) Secretion of Wnt ligands requires Evi, a conserved transmembrane protein. *Cell* 125:523–533. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.009>
- Bellenguez C, Küçükali F, Jansen I, Andrade V, Morenau-Grau S, Amin N, et al (2020) Large meta-analysis of genome-wide association studies expands knowledge of the genetic etiology of Alzheimer's disease and highlights potential translational opportunities. *medRxiv* 17:10
- Buggia-Prévo V, Fernandez CG, Riordan S, Vetrivel KS, Roseman J, Waters J et al (2014) Axonal BACE1 dynamics and targeting in hippocampal neurons: A role for Rab11 GTPase. *Mol Neurodegener*. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-9-1>
- Calafate S, Flavin W, Verstrecken P, Moechars D (2016) Loss of Bin1 promotes the propagation of Tau pathology. *Cell Rep* 17:931–940. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.063>
- Cassar M, Kretschmar D (2016) Analysis of amyloid precursor protein function in *drosophila melanogaster*. *Front Mol Neurosci* 9:61. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00061>
- Cataldo AM, Peterhoff CM, Troncoso JC, Gomez-Isla T, Hyman BT, Nixon RA (2000) Endocytic pathway abnormalities precede amyloid beta deposition in sporadic Alzheimer's disease and Down syndrome: differential effects of APOE genotype and presenilin mutations. *Am J Pathol* 157:277–286
- Chapuis J, Hansmann F, Gistelincq M, Mounier A, Van Cauwenbergh C, Kolen KV et al (2013) Increased expression of BIN1 mediates Alzheimer

- genetic risk by modulating tau pathology. *Mol Psychiatry* 18:1225–1234. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.1>
10. Corces MR, Shcherbina A, Kundu S, Gloudemans MJ, Frésard L, Granja JM et al (2020) Single-cell epigenomic analyses implicate candidate causal variants at inherited risk loci for Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Nat Genet* 52:1158–1168. <https://doi.org/10.1038/s41588-020-00721-x>
  11. Crotti A, Sait HR, McAvoy KM, Estrada K, Ergun A, Szak S et al (2019) BIN1 favors the spreading of Tau via extracellular vesicles. *Sci Rep* 9:9477. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-45676-0>
  12. Dong J, Misselwitz R, Welfe H, Westermann P (2000) Expression and purification of dynamin II domains and initial studies on structure and function. *Protein Expr Purif* 20:314–323. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1305>
  13. Dourlen P, Bertin B, Chatelain G, Robin M, Napoletano F, Roux MJ et al (2012) Drosophila fatty acid transport protein regulates rhodopsin-1 metabolism and is required for photoreceptor neuron survival. *PLoS Genet* 8:e1002833. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002833>
  14. Dourlen P, Levet C, Mejat A, Gambis A, Mollereau B (2013) The Tomato/GFP-FLP/FRT method for live imaging of mosaic adult Drosophila photoreceptor cells. *J Vis Exp* 79:e50610. <https://doi.org/10.3791/50610> PMID: 24084155
  15. Dourlen P, Kilinc D, Malmanche N, Chapuis J, Lambert J-C (2019) The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathol* 138:221–236. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02004-0>
  16. Dunst S, Kazimiers T, von Zadow F, Jambor H, Sagner A, Brankatschk B et al (2015) Endogenously tagged Rab proteins: a resource to study membrane trafficking in Drosophila. *Dev Cell* 33:351–365. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2015.03.022>
  17. Fouillet A, Levet C, Virgone A, Robin M, Dourlen P, Rieusset J et al (2012) ER stress inhibits neuronal death by promoting autophagy. *Autophagy* 8:915–926. <https://doi.org/10.4161/auto.19716>
  18. Franzmeier N, Ossenkoppele R, Brendel M, Rubinski A, Smith R, Kumar A et al (2021) The BIN1 rs744373 Alzheimer's disease risk SNP is associated with faster A $\beta$ -associated tau accumulation and cognitive decline. *Alzheimer's Dement*. <https://doi.org/10.1002/alz.12371>
  19. Franzmeier N, Rubinski A, Neitzel J, Ewers M, Weiner MW, Aisen P et al (2019) The BIN1 rs744373 SNP is associated with increased tau-PET levels and impaired memory. *Nat Commun*. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09564-5>
  20. Gatz M, Reynolds CA, Fratiglioni L, Johansson B, Mortimer JA, Berg S et al (2006) Role of genes and environments for explaining Alzheimer disease. *Arch Gen Psychiatry* 63:168–174. <https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>
  21. Glennon EBC, Whitehouse LJ, Miners JS, Kehoe PG, Love S, Kellett KAB et al (2013) BIN1 is decreased in sporadic but not familial Alzheimer's disease or in aging. *PLoS ONE* 8:e78806. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078806>
  22. Grabs D, Slepnev VI, Songyang Z, David C, Lynch M, Cantley LC et al (1997) The SH3 domain of amphiphysin binds the proline-rich domain of dynamin at a single site that defines a new SH3 binding consensus sequence. *J Biol Chem* 272:13419–13425. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.20.13419>
  23. Haass C, Kaether C, Thinakaran G, Sisodia S (2012) Trafficking and proteolytic processing of APP. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>
  24. Holler CJ, Davis PR, Beckett TL, Platt TL, Webb RL, Head E et al (2014) Bridging integrator 1 (BIN1) protein expression increases in the Alzheimer's disease brain and correlates with neurofibrillary tangle pathology. *J Alzheimer's Dis* 42:1221–1227. <https://doi.org/10.3233/JAD-132450>
  25. Hung C, Tuck E, Stubbs V, van der Lee SJ, Aalfs C, van Spaendonk R et al (2021) SORL1 deficiency in human excitatory neurons causes APP-dependent defects in the endolysosome-autophagy network. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2021.109259>
  26. Huser S, Suri G, Crotter P, Spiess M (2013) Interaction of amphiphysins with AP-1 clathrin adaptors at the membrane. *Biochem J* 450:73–83. <https://doi.org/10.1042/BJ20121373>
  27. Israel MA, Yuan SH, Bardy C, Reyna SM, Mu Y, Herrera C et al (2012) Probing sporadic and familial Alzheimer's disease using induced pluripotent stem cells. *Nature* 482:216–220. <https://doi.org/10.1038/nature10821>
  28. Jiang Y, Rigoglioso A, Peterhoff CM, Pawlik M, Sato Y, Bleiwas C et al (2016) Partial BACE1 reduction in a Down syndrome mouse model blocks Alzheimer-related endosomal anomalies and cholinergic neurodegeneration: role of APP-CTF. *Neurobiol Aging* 39:90–98. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2015.11.013>
  29. Kajihito H, Saito K, Tsujita K, Kontani K, Araki Y, Kurosu H et al (2003) RIN3: A novel Rab5 GEF interacting with amphiphysin II involved in the early endocytic pathway. *J Cell Sci* 116:4159–4168
  30. Kessissoglou IA, Langui D, Hasan A, Maral M, Dutta SB, Hiesinger PR et al (2020) The Drosophila amyloid precursor protein homologue mediates neuronal survival and neuroglial interactions. *PLoS Biol* 18:e3000703. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.3000703>
  31. Kim S, Sato Y, Mohan PS, Peterhoff C, Pensalfini A, Rigoglioso A et al (2016) Evidence that the rab5 effector APPL1 mediates APP- $\beta$ CTF-induced dysfunction of endosomes in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* 21:707–716. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.97>
  32. Knupp A, Mishra S, Martinez R, Braggin JE, Szabo M, Kinoshita C et al (2020) Depletion of the AD risk gene SORL1 selectively impairs neuronal endosomal traffic independent of amyloidogenic APP processing. *Cell Rep*. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.107719>
  33. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC et al (2019) Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet* 51:414–430. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>
  34. Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy E, Paquet D, Duffield M et al (2019) A large panel of isogenic APP and PSEN1 mutant human iPSC neurons reveals shared endosomal abnormalities mediated by APP  $\beta$ -CTFs, not A $\beta$ . *Neuron*. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.010>
  35. Lambert J-C, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C et al (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45:1452–1458. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>
  36. Lauwers E, Wang Y-C, Gallardo R, Van der Kant R, Michiels E, Swerts J et al (2018) Hsp90 mediates membrane deformation and exosome release. *Mol Cell* 71:689–702.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.07.016>
  37. Leventis PA, Chow BM, Stewart BA, Iyengar B, Campos AR, Boulianne GL (2001) Drosophila Amphiphysin is a post-synaptic protein required for normal locomotion but not endocytosis. *Traffic* 2:839–850
  38. Love MI, Huber W, Anders S (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol*. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>
  39. Malki I, Cantrelle FX, Sottejeau Y, Lippens G, Lambert JC, Landrieu I (2017) Regulation of the interaction between the neuronal BIN1 isoform 1 and Tau proteins—role of the SH3 domain. *FEBS J* 284:3218–3229. <https://doi.org/10.1111/febs.14185>
  40. Malmanche N, Dourlen P, Gistelinc M, Demiautte F, Link N, Dupont C et al (2017) Developmental expression of 4-repeat-Tau Induces neuronal aneuploidy in Drosophila Tauopathy models. *Sci Rep* 7:40764. <https://doi.org/10.1038/srep40764>
  41. Marques-Coelho D, Iohan L da CC, Melo de Farias AR, Flaig A, Letournel F, Martin-Négrier ML, et al (2021) Differential transcript usage unravels gene expression alterations in Alzheimer's disease human brains. *NPJ Aging Mech Dis* 7. <https://doi.org/10.1038/s41514-020-00052-5>
  42. Miyagawa T, Ebinuma I, Morohashi Y, Hori Y, Young Chang M, Hattori H et al (2016) BIN1 regulates BACE1 intracellular trafficking and amyloid- $\beta$  production. *Hum Mol Genet* 25:2948–2958. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddw146>
  43. Mu FT, Callaghan JM, Steele-Mortimer O, Stenmark H, Parton RG, Campbell PL et al (1995) EEA1, an early endosome-associated protein. EEA1 is a conserved  $\alpha$ -helical peripheral membrane protein flanked by cysteine "fingers" and contains a calmodulin-binding IQ motif. *J Biol Chem* 270:13503–13511. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.22.13503>
  44. Nicot A-S, Toussaint A, Tosch V, Kretz C, Wallgren-Pettersson C, Iwarsson E et al (2007) Mutations in amphiphysin 2 (BIN1) disrupt interaction with dynamin 2 and cause autosomal recessive centronuclear myopathy. *Nat Genet* 39:1134–1139. <https://doi.org/10.1038/ng2086>
  45. Nixon RA (2017) Amyloid precursor protein and endosomal-lysosomal dysfunction in Alzheimer's disease: inseparable partners in a multifactorial disease. *FASEB J* 31:2729–2743. <https://doi.org/10.1096/fj.201700359>
  46. Nott A, Holtman IR, Coufal NG, Schlachetzki JCM, Yu M, Hu R et al (2019) Brain cell type-specific enhancer-promoter interactome maps and



- disease-risk association. *Science* (80- ) 366:1134–1139. <https://doi.org/10.1126/science.aay0793>
47. Pensalfini A, Jiang Y, Kim S, Nixon RA (2021) Assessing activation in health and disease. In: *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ), pp 273–294
  48. Pensalfini A, Kim S, Subbanna S, Bleiwas C, Goulbourne CN, Stavrides PH et al (2020) Endosomal dysfunction induced by directly overactivating Rab5 recapitulates prodromal and neurodegenerative features of Alzheimer's disease. *Cell Rep* 33:108420. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.108420>
  49. Prokic I, Cowling BS, Laporte J (2014) Amphiphysin 2 (BIN1) in physiology and diseases. *J Mol Med* 92:453–463. <https://doi.org/10.1007/s00109-014-1138-1>
  50. Ramjaun AR, McPherson PS (1998) Multiple amphiphysin II splice variants display differential clathrin binding: identification of two distinct clathrin-binding sites. *J Neurochem* 70:2369–2376
  51. Ramjaun AR, Philie J, De Heuvel E, McPherson PS (1999) The N terminus of amphiphysin II mediates dimerization and plasma membrane targeting. *J Biol Chem* 274:19785–19791. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.28.19785>
  52. De Rossi P, Buggia-Prévoit V, Clayton BLL, Vasquez JB, van Sanford C, Andrew RJ et al (2016) Predominant expression of Alzheimer's disease-associated BIN1 in mature oligodendrocytes and localization to white matter tracts. *Mol Neurodegener* 11:59. <https://doi.org/10.1186/s13024-016-0124-1>
  53. De Rossi P, Nomura T, Andrew RJ, Masse NY, Sampathkumar V, Musial TF et al (2020) Neuronal BIN1 regulates presynaptic neurotransmitter release and memory consolidation. *Cell Rep* 30:3520–3535.e7. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2020.02.026>
  54. Sartori M, Mendes T, Desai S, Lasorsa A, Herledan A, Malmanche N et al (2019) BIN1 recovers tauopathy-induced long-term memory deficits in mice and interacts with Tau through Thr348 phosphorylation. *Acta Neuropathol* 138:631–652. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02017-9>
  55. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, Pietzsch T et al (2012) Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9:676–682
  56. Schürmann B, Birmingham DP, Kopeikina KJ, Myczek K, Yoon S, Horan KE et al (2020) A novel role for the late-onset Alzheimer's disease (LOAD)-associated protein Bin1 in regulating postsynaptic trafficking and glutamatergic signaling. *Mol Psychiatry* 25:2000–2016. <https://doi.org/10.1038/s41380-019-0407-3>
  57. Shen R, Zhao X, He L, Ding Y, Xu W, Lin S et al (2020) Upregulation of RIN3 induces endosomal dysfunction in Alzheimer's disease. *Transl Neurodegener*. <https://doi.org/10.1186/s40035-020-00206-1>
  58. Small SA, Simoes-Spassov S, Mayeux R, Petsko GA (2017) Endosomal traffic jams represent a pathogenic hub and therapeutic target in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci* 40:592–602
  59. Sottejeau Y, Bretteville A, Cantrelle F-X, Malmanche N, Demiaute F, Mendes T et al (2015) Tau phosphorylation regulates the interaction between BIN1's SH3 domain and Tau's proline-rich domain. *Acta Neuropathol Commun* 3:58. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0237-8>
  60. Taga M, Petyuk VA, White C, Marsh G, Ma Y, Klein H-U et al (2020) BIN1 protein isoforms are differentially expressed in astrocytes, neurons, and microglia: neuronal and astrocyte BIN1 are implicated in tau pathology. *Mol Neurodegener* 15:44. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00387-3>
  61. Taga M, Petyuk VA, White C, Marsh G, Ma Y, Klein HU et al (2020) BIN1 protein isoforms are differentially expressed in astrocytes, neurons, and microglia: neuronal and astrocyte BIN1 are implicated in tau pathology. *Mol Neurodegener*. <https://doi.org/10.1186/s13024-020-00387-3>
  62. Ubelmann F, Burrinha T, Salavessa L, Gomes R, Ferreira C, Moreno N et al (2017) Bin1 and CD2AP polarise the endocytic generation of beta-amyloid. *EMBO Rep* 18:102–122. <https://doi.org/10.15252/embr.201642738>
  63. Udayar V, Buggia-Prévoit V, Guerreiro RL, Siegel G, Rambabu N, Sothoo AL et al (2013) A Paired RNAi and RabGAP overexpression screen identifies Rab11 as a regulator of  $\beta$ -amyloid production. *Cell Rep* 5:1536–1551. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.12.005>
  64. Wang T, Montell C (2007) Phototransduction and retinal degeneration in *Drosophila*. *Pflugers Arch* 454:821–847. <https://doi.org/10.1007/s00424-007-0251-1>
  65. Wigge P, Köhler K, Vallis Y, Doyle CA, Owen D, Hunt SP et al (1997) Amphiphysin heterodimers: potential role in clathrin-mediated endocytosis. *Mol Biol Cell* 8:2003–2015
  66. Woodruff G, Reyna SM, Dunlap M, Van Der Kant R, Callender JA, Young JE et al (2016) Defective transcytosis of APP and lipoproteins in human iPSC-derived neurons with familial Alzheimer's disease mutations. *Cell Rep* 17:759–773. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.034>
  67. Zelhof AC, Bao H, Hardy RW, Razzaq A, Zhang B, Doe CQ (2001) *Drosophila* Amphiphysin is implicated in protein localization and membrane morphogenesis but not in synaptic vesicle endocytosis. *Development* 128:5005–5015
  68. Zhang J, Schulze KL, Robin Hiesinger P, Suyama K, Wang S, Fish M et al (2007) Thirty-one flavors of *Drosophila* Rab proteins. *Genetics* 176:1307–1322. <https://doi.org/10.1534/genetics.106.066761>
  69. Zhou Y, Hayashi I, Wong J, Tugusheva K, Renger JJ, Zerbinatti C (2014) Intracellular clusterin interacts with brain isoforms of the bridging integrator 1 and with the microtubule-associated protein Tau in Alzheimer's disease. *PLoS ONE* 9:e103187. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0103187>

## Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

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

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

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)





## Supplementary information to

# The Alzheimer susceptibility gene *BIN1* induces isoform-dependent neurotoxicity through early endosome defects

Acta Neuropathologica Communications

Erwan Lambert<sup>1,#</sup>, Orthis Saha<sup>1,#</sup>, Bruna Soares Landeira<sup>1</sup>, Ana Raquel Melo de Farias<sup>1,2</sup>, Xavier Hermant<sup>1</sup>, Arnaud Carrier<sup>3</sup>, Alexandre Pelletier<sup>3</sup>, Lindsay Davoine<sup>1</sup>, Cloé Dupont<sup>1</sup>, Philippe Amouyel<sup>1</sup>, Amélie Bonnefond<sup>3</sup>, Frank Lafont<sup>4</sup>, Farida Abdelfettah<sup>1</sup>, Patrik Verstreken<sup>5,6</sup>, Julien Chapuis<sup>1</sup>, Nicolas Barois<sup>4,7</sup>, Fabien Delahaye<sup>3</sup>, Bart Dermaut<sup>8</sup>, Jean-Charles Lambert<sup>1</sup>, Marcos R. Costa<sup>1,2,##,\*</sup>, Pierre Dourlen<sup>1,##,\*</sup>

1. Univ. Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167-RID-AGE facteurs de risque et déterminants moléculaires des maladies liées au vieillissement, DISTALZ, Lille, France
2. Brain Institute, Federal University of Rio Grande do Norte, Natal, Brazil
3. Univ. Lille, Inserm, CNRS, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1283-UMR 8199 EGID, Lille, France
4. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019-UMR 9017-CIIL-Center for Infection and Immunity of Lille, Lille, France.
5. VIB Center for Brain & Disease Research, KU Leuven, Leuven, Belgium.
6. Department of Neurosciences, Leuven Brain Institute, KU Leuven, Leuven, Belgium.
7. Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, US41-UMS2014-PLBS, Lille, France.
8. Centre for Medical Genetics, Ghent University Hospital, Ghent, Belgium

#co-first

##co-last

\*corresponding authors

Correspondence should be addressed to:

Marcos Costa, MD, PhD  
INSERM UMR1167  
Institut Pasteur de Lille  
1 rue du Pr. Calmette  
59019 Lille cedex, France  
Tel: 00 33 (0)3 20 87 77 10  
[marcos.costa@pasteur-lille.fr](mailto:marcos.costa@pasteur-lille.fr)

Pierre Dourlen, PhD  
INSERM UMR1167  
Institut Pasteur de Lille  
1 rue du Pr. Calmette  
59019 Lille cedex, France  
Tel : 00 33 (0)3 20 87 77 10  
[pierre.dourlen@pasteur-lille.fr](mailto:pierre.dourlen@pasteur-lille.fr)

## Generation and validation of transgenic drosophila lines expressing human BIN1 isoforms

To assess the role of BIN1 isoforms, we generated 3 transgenic *Drosophila* lines expressing 3 representative BIN1 isoforms, brain BIN1iso1, muscular BIN1iso8 and ubiquitous BIN1iso9 (supplementary method below). As a control, we also generated transgenic *Drosophila* lines expressing the longest dAmph isoform, dAmphA. We used the UAS/Gal4 system [1](Supplementary Fig. 1a) and  $\Phi$ C31-mediated targeted insertion of transgenes to express identical levels of BIN1 isoforms [3]. We used the attP40 and attP2 landing sites on the second and third chromosomes. We got 1 to 5 lines for each construct resulting from independent identical insertion events. To test the expression of human BIN1 isoforms, we crossed the lines with an eye-specific GMR driver line and performed a western blot analysis. The BIN1 isoforms were expressed with an expected difference in the molecular weight (BIN1iso1 theoretical MW 65kDa > BIN1iso8 theoretical MW 50kDa > BIN1iso9 theoretical MW 48kDa). Surprisingly, some of the supposed-to-be identical lines expressed different levels of the same isoform. We selected 2 lines of each isoform inserted on the third chromosome and tested their expression at the RNA level by RT-qPCR (Supplementary method below, Supplementary Fig. 1b). We observed that basal expression levels were the same for all isoforms (BIN1iso1#3, BIN1iso8#1, BIN1iso8#2, BIN1iso9#2) except for two lines (BIN1iso1#1, BIN1iso9#1) expressing around twice as much BIN1 isoforms. This is likely due to the insertion of 2 copies of the transgenes. We repeated the western blot analysis for these lines which confirmed the higher expression of the two lines at the protein levels (Supplementary Fig. 1c). We decided to keep and use these lines to test for dose-dependent effects. We also observed that the basal level-expressing BIN1iso1 line exhibited non-significant higher protein levels of BIN1iso1 than BIN1iso8 and BIN1iso9 (significant difference only between BIN1iso1#3 and BIN1iso8#1,  $p=0.023$ , ANOVA with post-hoc Tukey test). This indicates that BIN1iso1 tended to be more stable than BIN1iso8 and BIN1iso9 when expressed in the *Drosophila* eye. In the article, if not specified, we have used the basal level-expressing lines (BIN1iso1#3, BIN1iso8#1, BIN1iso9#2) on the third chromosome and “BIN1iso1 high” or “BIN1iso9 high” refers to the BIN1iso1#1 and BIN1iso9#1 highly expressing lines.

## Characterization of dAmph<sup>MI08903-TG4.0</sup> allele

The dAmph<sup>MI08903-TG4.0</sup> allele contains a Trojan Gal4 exon cassette in the first intron of dAmph [2, 4] (Supplementary Fig. 2). This allows Gal4 expression under the control of dAmph endogenous promoter while arresting dAmph transcription thanks to a polyadenylation signal located 3' of the GAL4. Because the first exon only contains 68nt of the dAmph coding DNA sequence, the expressed truncated protein consists only in around the first 25 amino acids of the protein and the mutation is likely null. To test this, we assessed dAmph protein expression and the climbing ability of compound heterozygous dAmph<sup>MI08903-TG4.0</sup> flies with the known dAmph<sup>5E3</sup> null allele [5]. We did not detect any dAmph in dAmph<sup>MI08903-TG4.0/5E3</sup> compound heterozygous fly protein extract (Fig. 1b). In addition, these flies had strong locomotor defect. They had a climbing score close to the one of Amph<sup>5E3/5E3</sup>, around 2, whereas control flies had a climbing score close to 5 (Fig. 1C). These results indicate that the Amph<sup>MI08903-TG4.0</sup> allele can be considered as a null allele.

## Supplementary methods

### Construction of *Drosophila* transgenesis vectors

BIN1iso1 cDNA, BIN1iso8 cDNA (kind gifts of J Laporte) and BIN1iso9 cDNAs (SC128163, OriGene Technologies, Inc., USA) were amplified by PCR using the forward primer CAAAATGGCAGAGATGGGCAGTAA and the reverse primer CTCGAGTCATGGGACCCTCTCAGTG, which allowed the insertion of a CAAA Kozak sequence upstream of the ATG and a CTCGAG XhoI restriction enzyme site after the stop codon. Of note, BIN1iso9 cDNA has two synonymous mutations, a C instead of a T at position 486 and a T instead of a C at position 864 from the initial ATG. Similarly dAmphA cDNA (LD19810 from the *Drosophila* Genomics Resource Center, Indiana University) was amplified by PCR using the forward primer CAAAATGACCGAAAATAAAGGCATAA and the reverse primer ACTTCACGCGTCCCATCTGACTCGAG. The PCR product was cloned into a pGEM-T Easy Vector (Promega). After sequence checking, we subcloned the insert using EcoRI and XhoI restriction enzyme into a pUAST-attB transgenesis vector. After sequence checking, transgenesis plasmids were sent to the Bestgene company (BestGene Inc, Chino Hills, USA) for embryo injection in  $y^1 w^{67c23}; P\{CaryP\}attP40$  and  $y^1 w^{67c23}; P\{CaryP\}attP2$  lines (attP sites on the II and III chromosomes respectively).

For BIN1iso1  $\Delta Ex7$  and BIN1iso1  $\Delta CLAP$ , cDNAs were synthesized by Invitrogen GeneArt gene synthesis adding upstream an EcoRI restriction enzyme site from the pGEMT-easy and the CAAA Kozak sequence, and adding downstream an XhoI site to have identical sequences around the cDNA and to allow the comparison with BIN1iso1 transgenic flies. BIN1iso1  $\Delta Ex7$  and BIN1iso1  $\Delta CLAP$  cDNAs correspond to BIN1iso1 cDNA without Exon7 for the former and Exon13-14-15-16 for the latter. cDNA was subcloned into a pUAST attB transgenesis vector and transgenic flies were generated as described above.

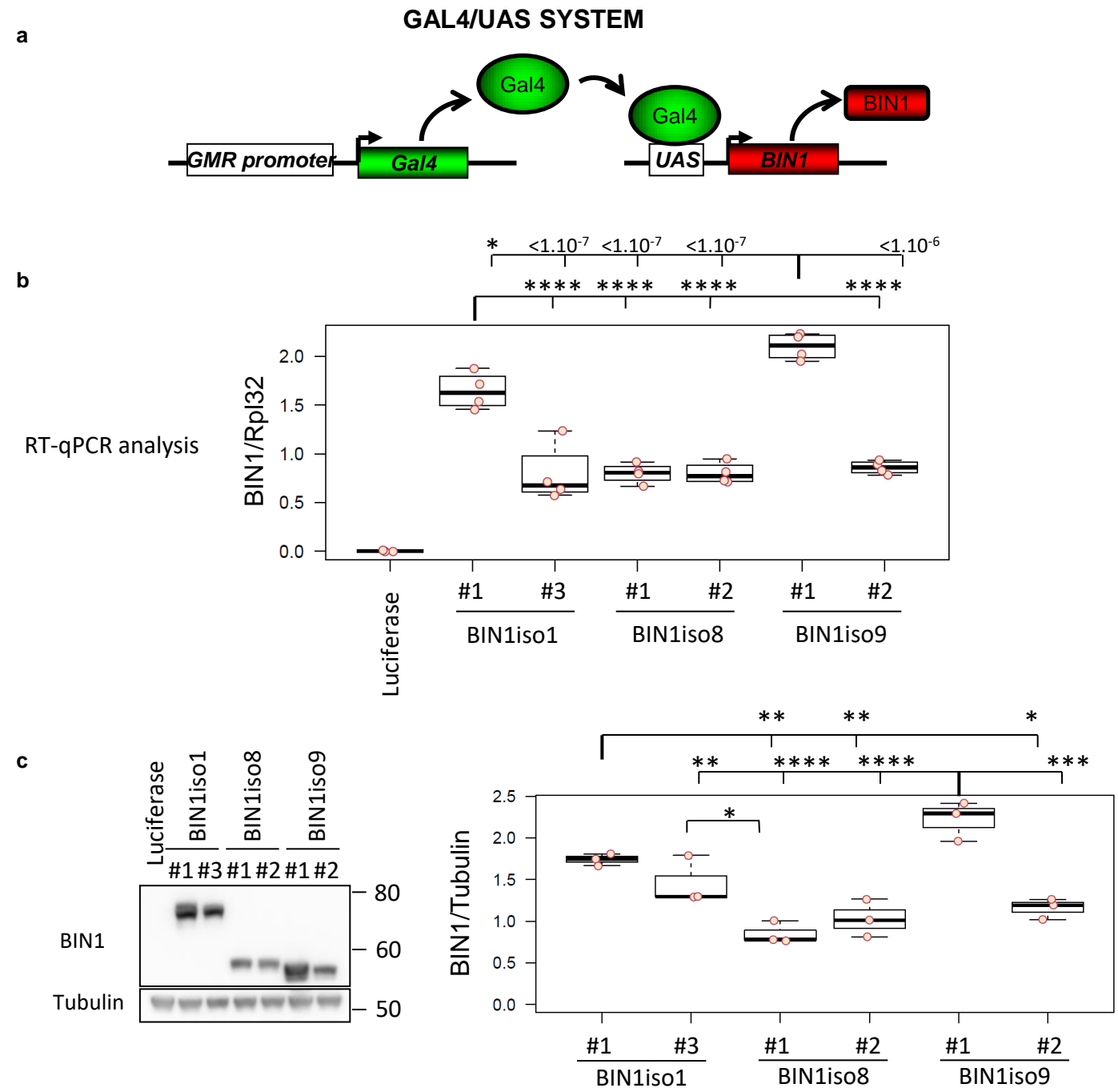
### RT-qPCR

RNA was extracted from 30 *Drosophila* heads per condition using Trizol reagent (15596018, Invitrogen) according to manufacturer instructions. Retrotranscription was performed using ThermoScript™ RT-PCR System (11146-024, Invitrogen) and PCR was performed in the AriaMx Real-time PCR System (G8830A, Agilent Technologies). The following primers were used: for BIN1, forward primer ATGTTCAAGGTACAGGCCCA and reverse primer TCAGTGAAGTTCTCGGGGAA, both primers are localized in exons common to all isoforms corresponding to the SH3 domain; for Rpl32, forward primer CCAAGGACTTCATCCGCCACC and reverse primer GCGGGTGCCTTGTTCGATCC.

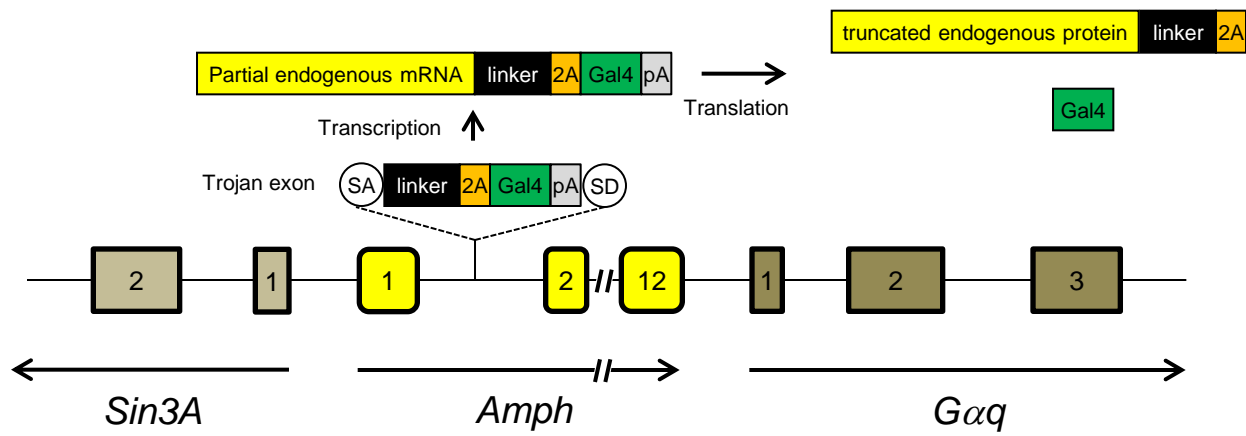
## References

1. Brand AH, Perrimon N (1993) Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development* 118:401–15
2. Diao F et al. (2015) Plug-and-play genetic access to drosophila cell types using exchangeable exon cassettes. *Cell Rep* 10:1410–21. doi: 10.1016/j.celrep.2015.01.059
3. Groth AC, Fish M, Nusse R, Calos MP (2004) Construction of Transgenic Drosophila by Using the Site-Specific Integrase from Phage  $\phi$ C31. *Genetics* 166:1775–1782. doi: 10.1534/genetics.166.4.1775
4. Lee PT et al. (2018) A gene-specific T2A-GAL4 library for drosophila. *Elife* 7. doi: 10.7554/eLife.35574
5. Leventis PA et al. (2001) Drosophila Amphiphysin is a post-synaptic protein required for normal locomotion but not endocytosis. *Traffic* 2:839–50

**Supplementary Fig. 1: Creation of transgenic lines expressing human BIN1 isoforms.** **a** Scheme of the Gal4/UAS system with the example of a GMR driver and a UAS construct expressing BIN1. **b** RT-qPCR analysis of BIN1 isoforms for 2 lines of each isoform on the third chromosome (ANOVA, post-hoc Tukey, \*  $p < 0.05$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ). **c** Western blot analysis of BIN1 isoforms for the same lines. Tubulin is used as a loading control (ANOVA, post-hoc Tukey, \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ ).

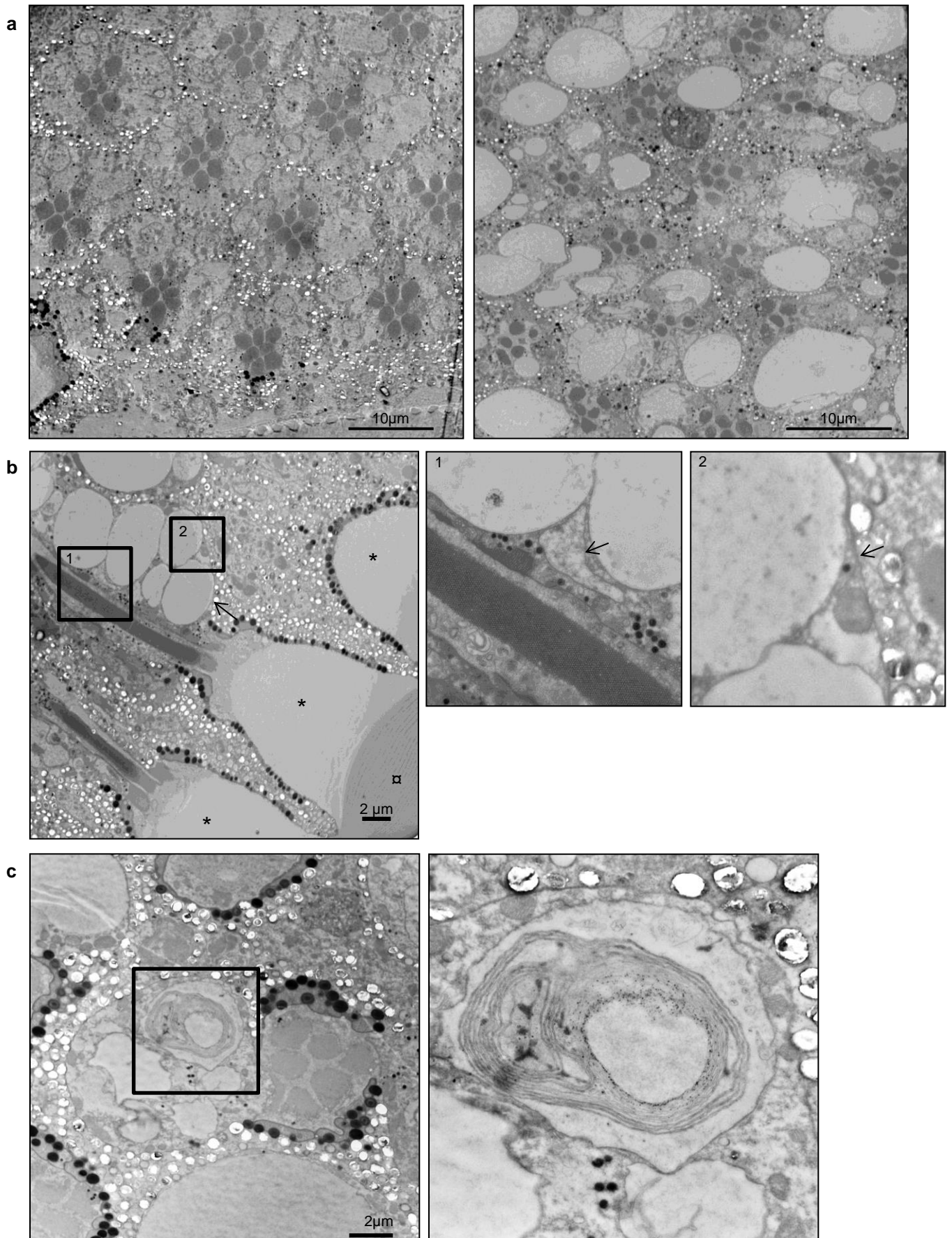


**Supplementary Fig. 2:** Scheme of *Amph*<sup>MI08903-TG4.0</sup> allele. SA=Splice acceptor site, SD=Splice donor site.





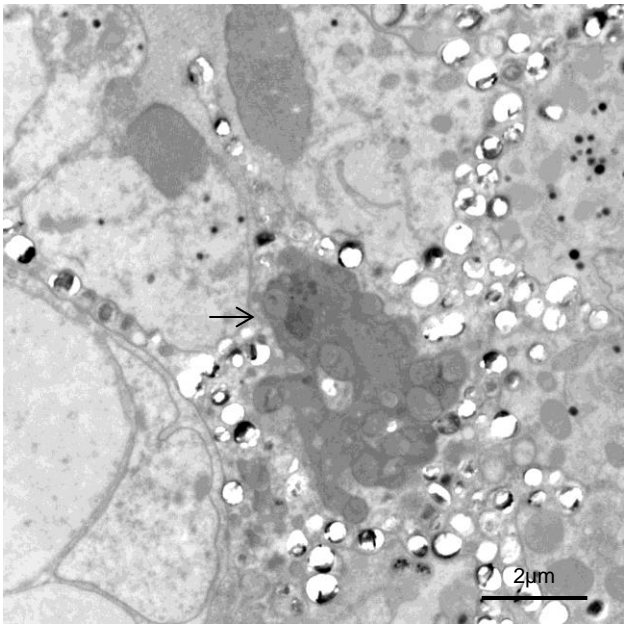
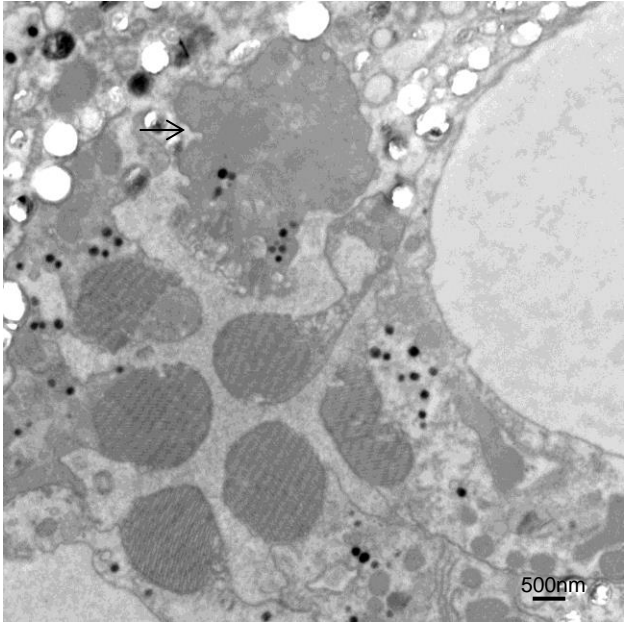
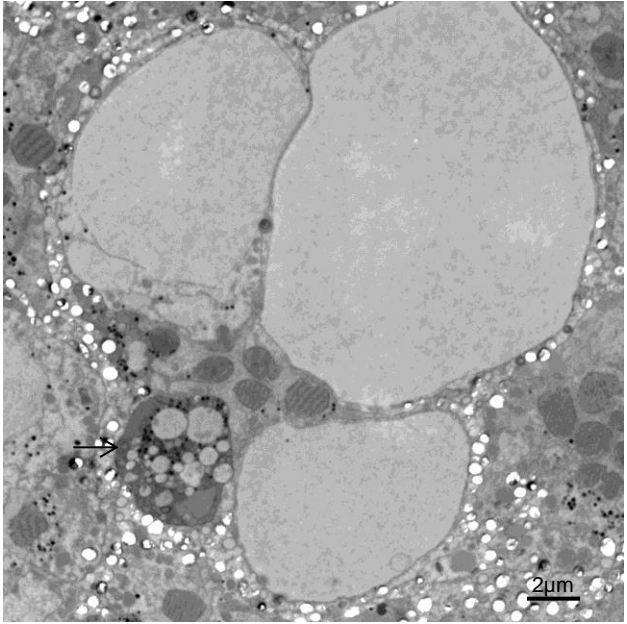
**Supplementary Fig. 4 : Electron microscopy images of BIN1-1-induced photoreceptor degeneration in *Drosophila* eyes.** **a** View of several ommatidia expressing luciferase as a control (left) or BIN1-1 (right) in 15 day-old flies. BIN1-1 expressing ommatidia exhibit many vesicles. **b** Longitudinal view of photoreceptor neurons in the distal part of the retina. Under the cornea ( $\alpha$ ) and pseudocone (\*), a photoreceptor neuron is filled with vesicles (arrow). The nucleus (arrow in the first inset) is squeezed but the chromatin seem normal. The cytoplasm is pushed on the side against the plasma membrane, which is not disrupted (arrow in the second inset). **c** Image showing a multilamellar body.



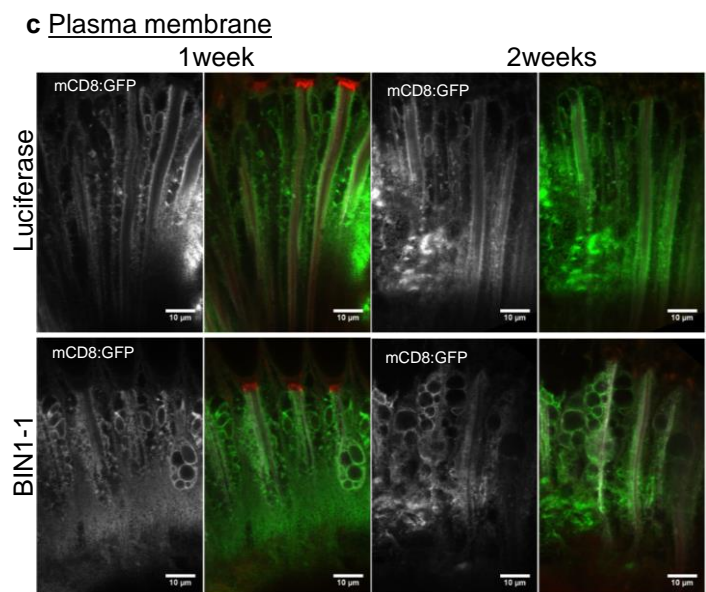
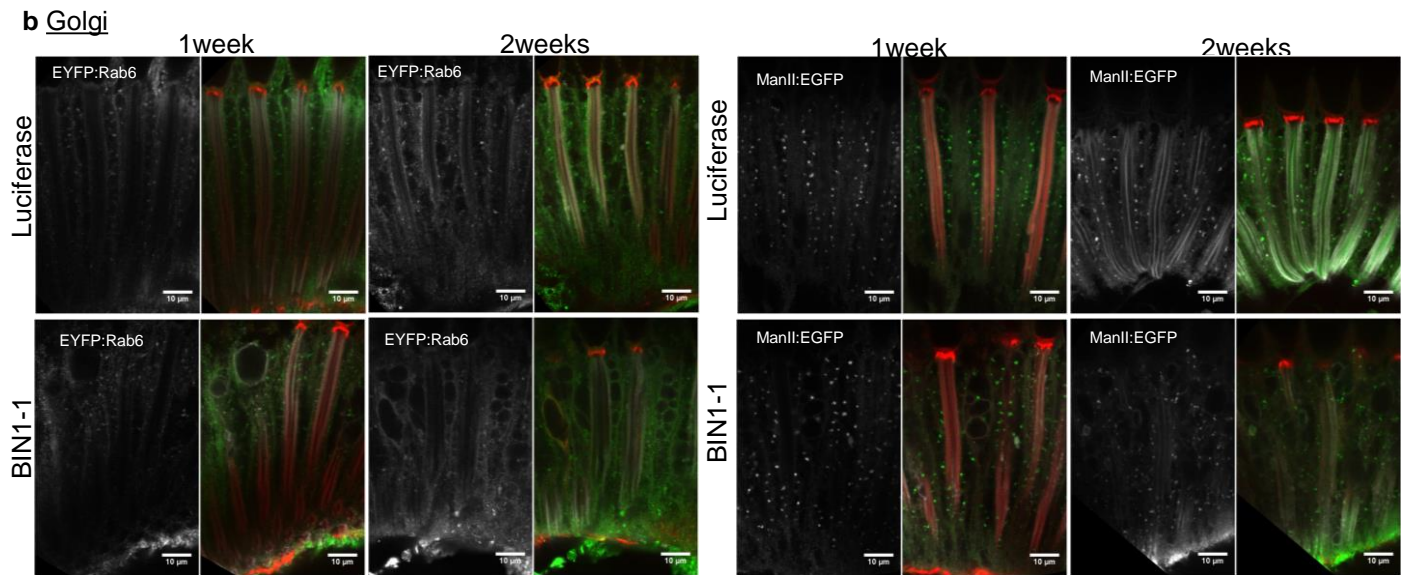
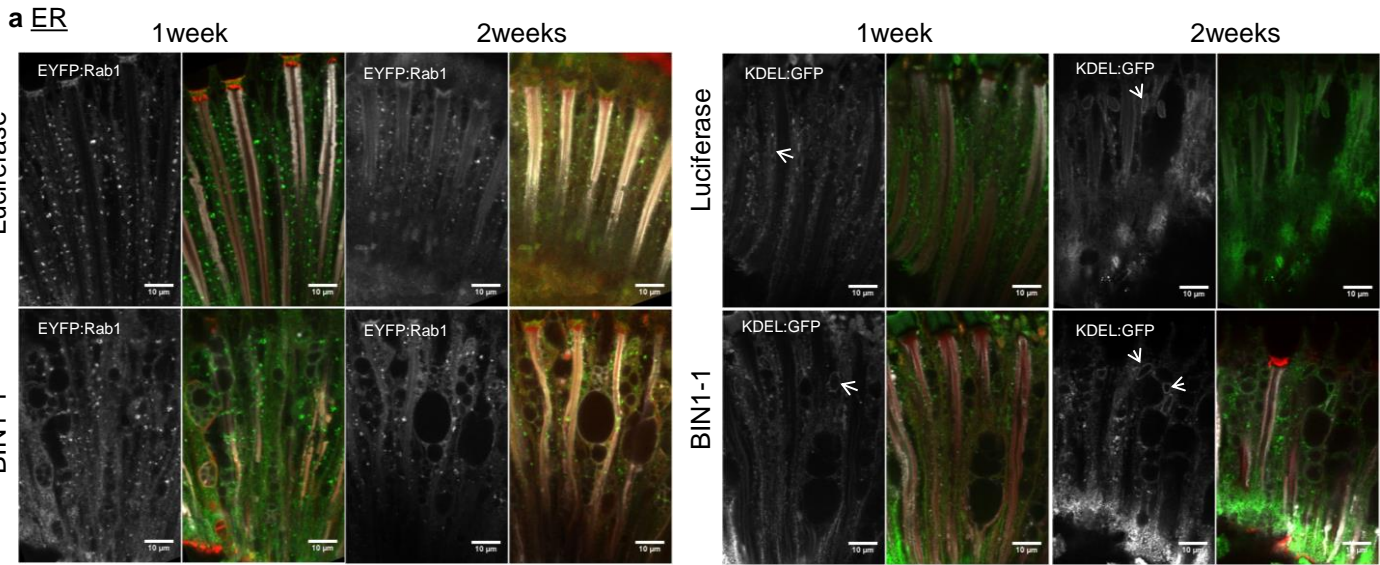


**Supplementary Fig. 4 : Electron microscopy images of BIN1-1-induced photoreceptor degeneration in *Drosophila* eyes. d** BIN1-1 expressing retina exhibited dying photoreceptor neurons. They first started to round up, their cytoplasm became electron-dense with abnormal mitochondria (arrow, upper left panel). They shrank (arrow, upper right panel) and were finally phagocytosed by the adjacent interommatidial cell (arrow, lower left panel).

d



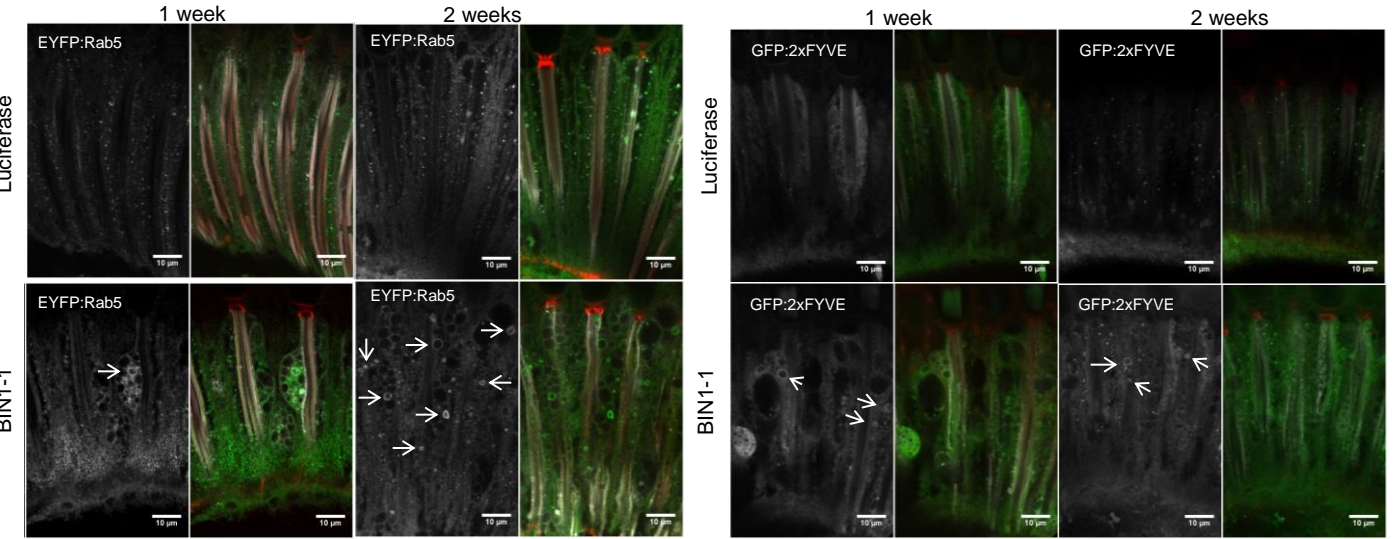
**Supplementary Fig. 5: Screening of organelle markers in BIN1-1-induced degenerating photoreceptor neurons.** BIN1-1-expressing flies were crossed with line expressing green fluorescent marker for ER **a**, Golgi **b**, plasma membrane **c**, early endosome **d**, late endosome/multivesicular body **e**, recycling endosome **f**, lysosome **g** and autophagosome **h**, and we let flies age for 1 and 2 weeks before dissection and immunofluorescence. Rh1 and actin labelling (respectively white and red in merge images) were used to visualize retinal structure and only green channels and merge images are shown. Note that the KDEL:GFP marker labelled nuclear envelop (arrows in **A**), early and late endosome/multivesicular body marker labelled small to middle size vesicles (arrows in **d, e**), the evi:GFP marker also labelled bigger vesicles (see image of one week-old flies) and the interrhabdomeric space (arrowhead in **e**), which likely corresponds to released exosomes, the Lamp2:GFP marker labelled on rare cases some middle to big size vesicles (arrow in **g**) and the autophagosome marker GFP:LC3 labelled small structures in the control and BIN1-1 conditions (arrows in **h**).



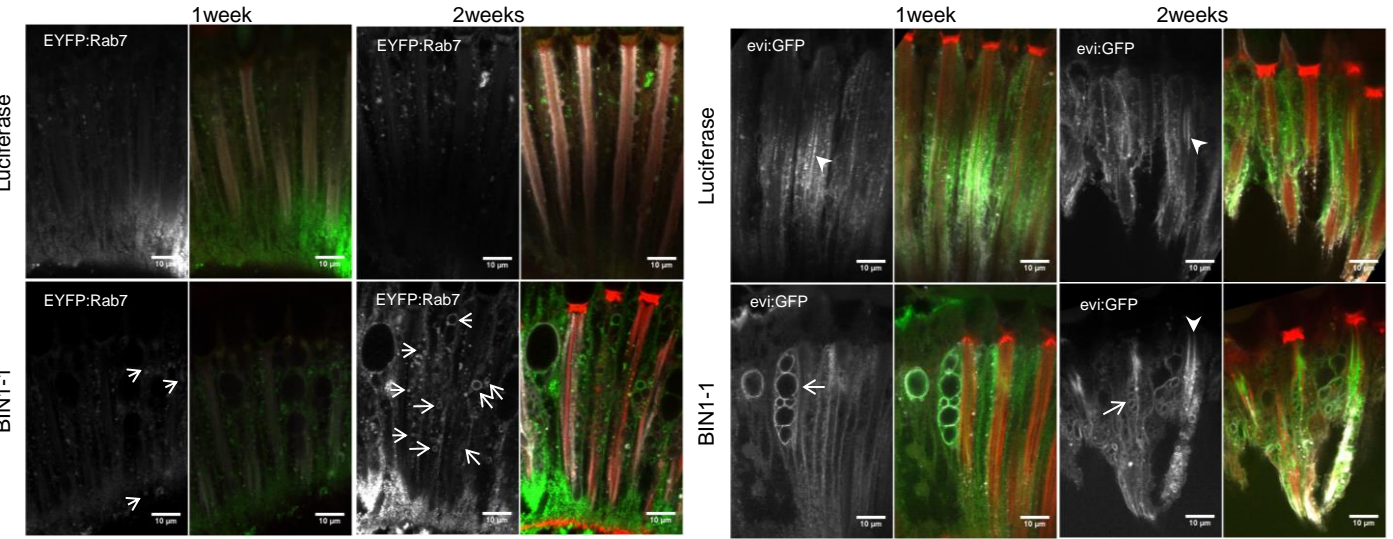


**Supplementary Fig. 5: Screening of organelle markers in BIN1-1-induced degenerating photoreceptor neurons.** BIN1-1-expressing flies were crossed with line expressing green fluorescent marker for ER **a**, Golgi **b**, plasma membrane **c**, early endosome **d**, late endosome/multivesicular body **e**, recycling endosome **f**, lysosome **g** and autophagosome **h**, and we let flies age for 1 and 2 weeks before dissection and immunofluorescence. Rh1 and actin labelling (respectively white and red in merge images) were used to visualize retinal structure and only green channels and merge images are shown. Note that the KDEL:GFP marker labelled nuclear envelop (arrows in **A**), early and late endosome/multivesicular body marker labelled small to middle size vesicles (arrows in **d**, **e**), the evi:GFP marker also labelled bigger vesicles (see image of one week-old flies) and the inter-rhabdomeric space (arrowhead in **e**), which likely corresponds to released exosomes, the Lamp2:GFP marker labelled on rare cases some middle to big size vesicles (arrow in **g**) and the autophagosome marker GFP:LC3 labelled small structures in the control and BIN1-1 conditions (arrows in **h**).

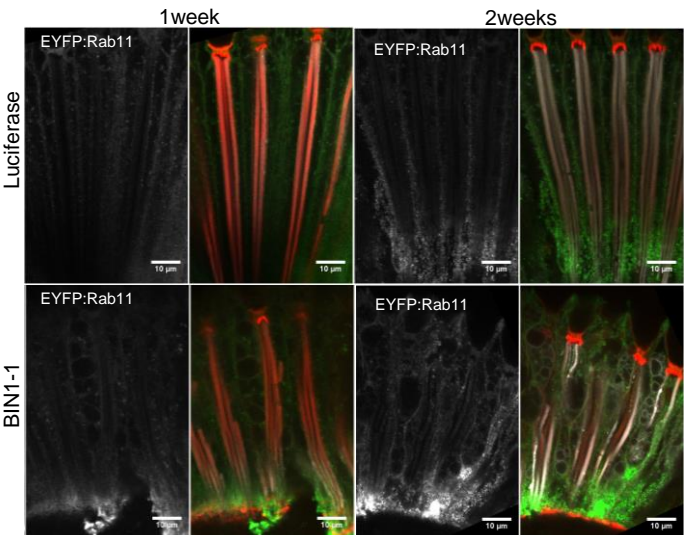
**d Early endosome**



**e Late endosome**

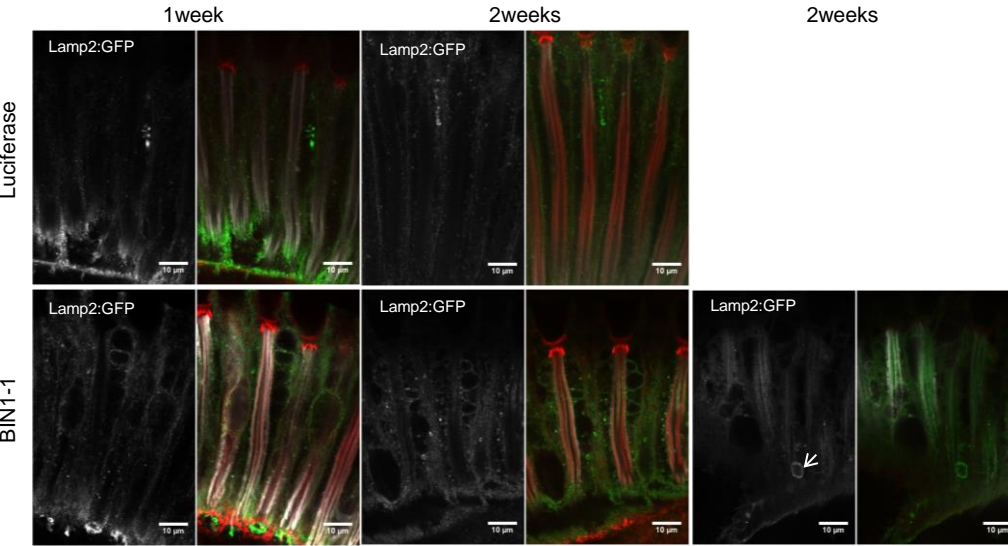


**f Recycling endosome**

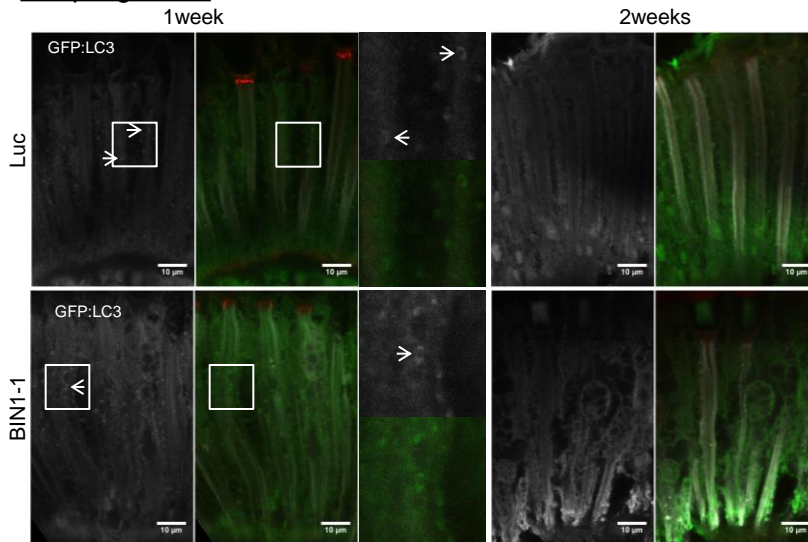


**Supplementary Fig. 5: Screening of organelle markers in BIN1-1-induced degenerating photoreceptor neurons.** BIN1-1-expressing flies were crossed with line expressing green fluorescent marker for ER **a**, Golgi **b**, plasma membrane **c**, early endosome **d**, late endosome/multivesicular body **e**, recycling endosome **f**, lysosome **g** and autophagosome **h**, and we let flies age for 1 and 2 weeks before dissection and immunofluorescence. Rh1 and actin labelling (respectively white and red in merge images) were used to visualize retinal structure and only green channels and merge images are shown. Note that the KDEL:GFP marker labelled nuclear envelop (arrows in **A**), early and late endosome/multivesicular body marker labelled small to middle size vesicles (arrows in **d**, **e**), the evi:GFP marker also labelled bigger vesicles (see image of one week-old flies) and the inter-rhabdomeric space (arrowhead in **e**), which likely corresponds to released exosomes, the Lamp2:GFP marker labelled on rare cases some middle to big size vesicles (arrow in **g**) and the autophagosome marker GFP:LC3 labelled small structures in the control and BIN1-1 conditions (arrows in **h**).

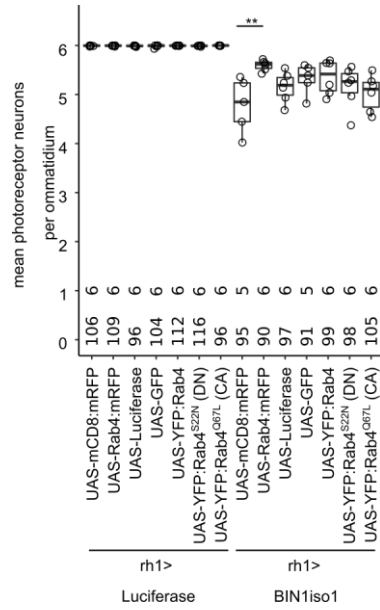
### g Lysosome



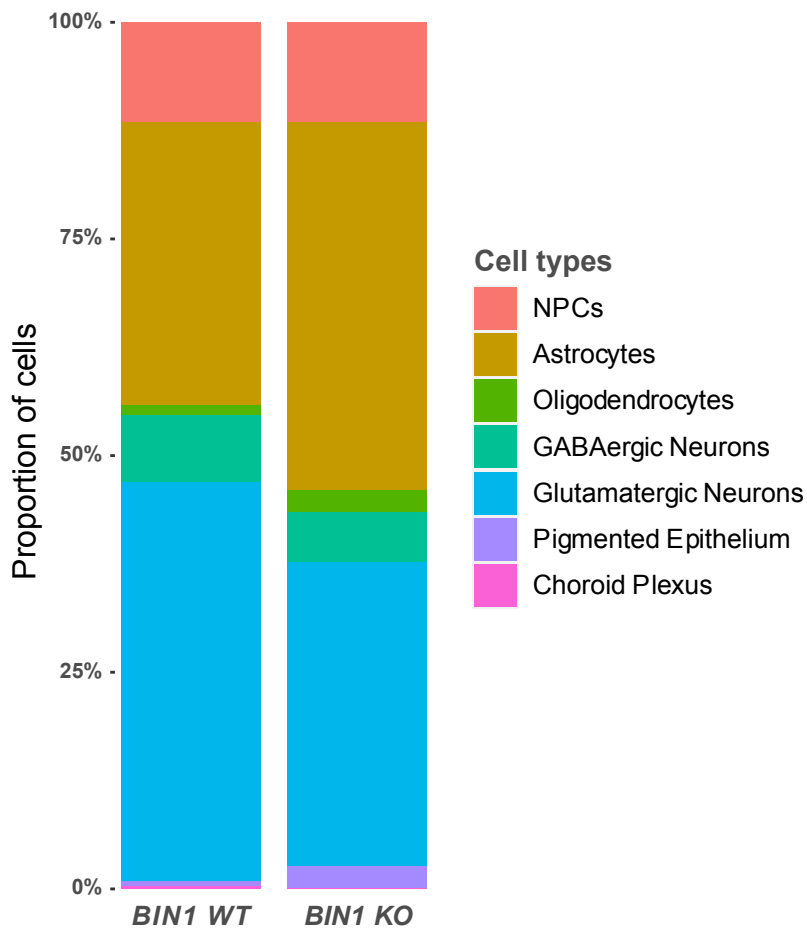
### h autophagosome



**Supplementary Fig. 6: Effect of Rab4 modulation in Drosophila photoreceptor neurons.** Quantification of the BIN1iso1-induced neurodegeneration upon overexpression of Rab4:mRFP, YFP:Rab4, YFP:Rab4<sup>S22N</sup> (DN) and YFP:Rab4<sup>Q67L</sup> (CA). The number of photoreceptor neurons per ommatidium is quantified in 15-day-old flies. Only the Rab4:mRFP condition is significantly different than the associated control mCD8:mRFP. Statistical analysis was performed using a Kruskal Wallis test ( $p=0.02236$ ) followed by Mann Whitney comparison (\*\*  $p<0.01$ ).



**Supplementary Fig. 7. Graphic representation of proportions of cell types (in percentages) in *BIN1* KO and *WT* cerebral organoids.** 190-day old organoids were subjected to single nucleus RNA sequencing. Specific cell type populations within the organoids are indicated by different colours.



gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	FoldChange
MYRIP	2,67E-42	0,79948442	0,607	0,398	8,94E-38	1,74047902
KCNQ3	1,80E-25	0,57353916	0,863	0,774	6,04E-21	1,48816982
GABRB1	5,53E-25	0,52143699	0,798	0,685	1,85E-20	1,43538424
ADGRB3	1,11E-22	0,43416594	0,99	0,991	3,72E-18	1,35112948
NELL1	1,91E-22	0,50738894	0,811	0,651	6,40E-18	1,42147521
AC092683.1	3,83E-22	0,39699011	0,671	0,508	1,28E-17	1,31675789
CUX2	2,18E-21	0,5367376	0,625	0,479	7,31E-17	1,45068833
CARMIL1	3,72E-21	0,50504686	0,563	0,374	1,25E-16	1,41916945
AL589740.1	4,18E-21	0,68128109	0,696	0,671	1,40E-16	1,60356306
ANKRD36C	7,51E-21	0,38996436	0,944	0,892	2,52E-16	1,31036103
PCDH9	9,30E-20	0,76521634	0,811	0,767	3,12E-15	1,69962484
DSCAM	1,63E-18	0,38296312	0,886	0,83	5,46E-14	1,3040174
FUT9	3,04E-18	0,39836283	0,83	0,738	1,02E-13	1,31801139
PRKG1	4,45E-16	0,45405215	0,742	0,676	1,49E-11	1,36988249
ZNF385B	5,53E-16	0,508192	0,502	0,41	1,85E-11	1,42226668
FLRT2	5,85E-16	0,43866482	0,75	0,678	1,96E-11	1,35534941
KHDRBS2	1,48E-15	0,39910963	0,817	0,759	4,96E-11	1,31869382
PCDH11Y	7,28E-14	0,48652642	0,367	0,289	2,44E-09	1,40106745
ST6GALNAC5	7,56E-14	0,52187834	0,571	0,459	2,53E-09	1,43582343
DPP10	1,28E-13	0,72899887	0,639	0,559	4,31E-09	1,65748851
EYS	2,01E-13	0,63359987	0,324	0,253	6,75E-09	1,55143136
GRIN2A	3,55E-12	0,44758404	0,774	0,675	1,19E-07	1,36375458
KCNQ5	4,06E-12	0,67281434	0,625	0,548	1,36E-07	1,59417979
GRID2	5,52E-12	0,57441215	0,499	0,378	1,85E-07	1,4890706
MEIS2	6,43E-12	0,38367542	0,811	0,781	2,16E-07	1,30466139
MTUS2	7,31E-12	0,43704762	0,464	0,353	2,45E-07	1,35383097
PTPRT	2,30E-11	0,54196675	0,382	0,304	7,71E-07	1,455956
SAMD5	9,07E-11	0,38762765	0,312	0,181	3,04E-06	1,30824038
HDAC9	1,03E-10	0,42211329	0,893	0,832	3,45E-06	1,33988882
ASIC2	1,13E-10	0,4711558	0,439	0,354	3,80E-06	1,38621958
GRM7	6,72E-10	0,42473644	0,913	0,942	2,26E-05	1,34232726
NRG1	8,08E-10	0,53329798	0,653	0,602	2,71E-05	1,44723377
LRRC4C	8,72E-10	0,46786008	0,742	0,722	2,93E-05	1,38305649
GALNT13	1,20E-09	0,40856349	0,445	0,353	4,03E-05	1,32736349
LRP1B	5,28E-09	0,44596192	0,467	0,367	0,0001772	1,36222208
ADGRV1	5,84E-09	0,40473579	0,483	0,403	0,00019583	1,32384644
PKIB	6,95E-09	0,40590358	0,261	0,103	0,00023317	1,32491847
NCAM2	1,85E-08	0,41112496	0,493	0,401	0,00062081	1,32972228
CDH12	2,54E-08	0,61905021	0,7	0,627	0,00085241	1,53586373
PTPRK	1,56E-07	0,43922767	0,865	0,868	0,00521522	1,35587828
MDGA2	2,42E-07	0,43535922	0,51	0,508	0,00810837	1,35224749

gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	FoldChange
AUTS2	3,07E-43	0,4628003	0,983	0,954	1,03E-38	1,37821437
PTPRK	6,28E-40	0,43727206	0,962	0,916	2,11E-35	1,3540416
ADGRV1	4,68E-38	0,46762682	0,976	0,982	1,57E-33	1,38283288
NPAS3	1,43E-37	0,40865973	0,992	0,995	4,79E-33	1,32745203
AC104041.1	3,19E-34	0,44050957	0,95	0,903	1,07E-29	1,35708358
CERS6	3,39E-30	0,41850684	0,862	0,737	1,14E-25	1,33654354
VEGFA	2,56E-29	0,5543331	0,488	0,246	8,58E-25	1,46848965
STK39	1,00E-28	0,38699114	0,886	0,772	3,36E-24	1,30766332
SMYD3	2,04E-27	0,44224888	0,87	0,793	6,84E-23	1,35872066
PTPRM	4,33E-27	0,39789641	0,917	0,849	1,45E-22	1,31758534
IMMP2L	4,86E-27	0,53479554	0,826	0,714	1,63E-22	1,44873682
FUT8	1,88E-26	0,39861311	0,882	0,783	6,32E-22	1,31824005
RORA	2,89E-26	0,40650677	0,943	0,923	9,71E-22	1,32547253
FUT9	5,22E-26	0,38158277	0,974	0,969	1,75E-21	1,30277033
DST	1,89E-25	0,38587066	0,975	0,944	6,32E-21	1,30664811
DMD	1,92E-25	0,45391792	0,942	0,893	6,45E-21	1,36975505
RALGAPA2	2,18E-25	0,38478936	0,907	0,841	7,30E-21	1,30566914
NRG1	4,19E-25	0,68164064	0,83	0,749	1,41E-20	1,60396275
CEP128	1,06E-24	0,62628014	0,575	0,404	3,54E-20	1,54357987
LINC01515	2,81E-24	0,47334489	0,587	0,381	9,43E-20	1,38832457
GRAMD1B	4,32E-24	0,40085403	0,682	0,496	1,45E-19	1,32028925
KAZN	2,93E-22	0,41134672	0,889	0,806	9,83E-18	1,32992669
AL589740.1	3,29E-22	0,40709925	0,957	0,954	1,10E-17	1,32601698
LRRC3B	1,22E-21	0,38726688	0,851	0,785	4,09E-17	1,30791327
GLIS3	6,78E-21	0,382624	0,957	0,936	2,27E-16	1,30371091
L3MBTL4	2,83E-20	0,40619426	0,767	0,591	9,50E-16	1,32518544
ROBO2	3,67E-20	0,46087373	0,988	0,995	1,23E-15	1,37637513
AL022068.1	1,66E-19	0,81735724	0,53	0,381	5,55E-15	1,76217504
DLGAP1	2,66E-19	0,40413534	0,939	0,946	8,93E-15	1,32329557
GPC5	7,45E-18	0,61010791	0,757	0,716	2,50E-13	1,52637338
AP002989.1	6,00E-17	0,53033931	0,545	0,396	2,01E-12	1,44426884
AC091826.2	6,37E-17	0,38353074	0,839	0,831	2,14E-12	1,30453055
FHIT	4,54E-16	0,42244059	0,492	0,338	1,52E-11	1,34019283
AC010099.4	3,94E-14	0,38200612	0,636	0,542	1,32E-09	1,30315268
PLEKHA5	4,27E-14	0,39791398	0,842	0,795	1,43E-09	1,31760139
PPFIA2	4,90E-14	0,37908107	0,788	0,737	1,64E-09	1,30051323
AC007262.2	1,47E-13	0,38033451	0,509	0,376	4,94E-09	1,30164363
CTNNA2	7,73E-12	0,63202347	0,797	0,693	2,59E-07	1,54973708
PTCHD1-AS	2,67E-11	0,4688972	0,603	0,496	8,96E-07	1,38405109
PCDH11X	5,30E-11	0,39301696	0,47	0,361	1,78E-06	1,31313657
GRIK1	5,97E-11	0,48020296	0,553	0,425	2,00E-06	1,39493989
SNTG1	5,21E-10	0,42578782	0,753	0,668	1,75E-05	1,34330585
MIR4300HG	1,52E-07	0,3926162	0,508	0,471	0,00509742	1,31277184



gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	FoldChange
ADGRV1	2,35E-10	0,74393104	0,923	0,806	7,89E-06	1,67473292
DANT2	5,93E-08	0,5191257	0,545	0,216	0,00198928	1,43308651

gene	p_val	avg_logFC	pct.1	pct.2	p_val_adj	FoldChange
HSP90AA1	2,14E-07	-1,1014768		0,5	1 0,00719246	0,4660392

term

GOBP\_REGULATION\_OF\_CELL\_PROJECTION\_ORGANIZATION  
GOBP\_REGULATION\_OF\_CELL\_JUNCTION\_ASSEMBLY  
GOBP\_CENTRAL\_NERVOUS\_SYSTEM\_DEVELOPMENT  
GOBP\_REGULATION\_OF\_MULTICELLULAR\_ORGANISMAL\_DEVELOPMENT  
GOBP\_REGULATION\_OF\_NERVOUS\_SYSTEM\_DEVELOPMENT  
GOBP\_REGULATION\_OF\_NEURON\_PROJECTION\_DEVELOPMENT  
GOBP\_REGULATION\_OF\_MEMBRANE\_POTENTIAL  
GOBP\_LOCOMOTION  
GOBP\_REGULATION\_OF\_CELLULAR\_COMPONENT\_MOVEMENT  
GOBP\_CELL\_CELL\_SIGNALING  
GOBP\_REGULATION\_OF\_POSTSYNAPTIC\_MEMBRANE\_POTENTIAL  
GOBP\_RESPONSE\_TO\_LIGHT\_STIMULUS  
GOBP\_REGULATION\_OF\_CELLULAR\_COMPONENT\_BIOGENESIS  
GOBP\_POSITIVE\_REGULATION\_OF\_MULTICELLULAR\_ORGANISMAL\_PROCESS  
GOBP\_CELL\_MORPHOGENESIS  
GOBP\_Glutamate\_Receptor\_Signaling\_Pathway  
GOBP\_REGULATION\_OF\_TRANS\_SYNAPTIC\_SIGNALING  
GOBP\_CELL\_MORPHOGENESIS\_INVOLVED\_IN\_DIFFERENTIATION  
GOBP\_RESPONSE\_TO\_RADIATION  
GOBP\_REGULATION\_OF\_CELL\_DIFFERENTIATION  
GOBP\_DENDRITE\_DEVELOPMENT  
GOBP\_REGULATION\_OF\_TRANSPORT  
GOBP\_INORGANIC\_ION\_TRANSMEMBRANE\_TRANSPORT  
GOBP\_REGULATION\_OF\_ION\_TRANSPORT  
GOBP\_BEHAVIOR  
GOBP\_COGNITION  
GOBP\_REGULATION\_OF\_TRANSMEMBRANE\_TRANSPORT  
GOBP\_CELL\_MORPHOGENESIS\_INVOLVED\_IN\_NEURON\_DIFFERENTIATION  
GOBP\_CHEMICAL\_SYNAPTIC\_TRANSMISSION\_POSTSYNAPTIC  
GOBP\_SENSORY\_PERCEPTION  
GOBP\_POSITIVE\_REGULATION\_OF\_CELL\_PROJECTION\_ORGANIZATION  
GOBP\_LEARNING  
GOBP\_STARTLE\_RESPONSE  
GOBP\_CELL\_PART\_MORPHOGENESIS  
GOBP\_CELL\_MIGRATION  
GOBP\_TRANSMEMBRANE\_TRANSPORT  
GOBP\_DENDRITE\_MORPHOGENESIS  
GOBP\_DETECTION\_OF ABIOTIC\_STIMULUS  
GOBP\_Ionotropic\_Glutamate\_Receptor\_Signaling\_Pathway  
GOBP\_HEAD\_DEVELOPMENT  
GOBP\_RESPONSE\_TO AMPHETAMINE  
GOBP\_CELLULAR\_COMPONENT\_MORPHOGENESIS  
GOBP\_RESPONSE\_TO ABIOTIC\_STIMULUS  
GOBP\_SENSORY\_PERCEPTION\_OF\_MECHANICAL\_STIMULUS  
GOBP\_DETECTION\_OF\_MECHANICAL\_STIMULUS\_INVOLVED\_IN\_SENSORY\_PERCEPTION  
GOBP\_CENTRAL\_NERVOUS\_SYSTEM\_NEURON\_DIFFERENTIATION  
GOBP\_POSITIVE\_REGULATION\_OF\_CELL\_DIFFERENTIATION  
GOBP\_POSITIVE\_REGULATION\_OF\_BONE\_MINERALIZATION  
GOBP\_REGULATION\_OF\_CELL\_DEVELOPMENT

GOBP\_RESPONSE\_TO\_MECHANICAL\_STIMULUS  
GOBP\_RESPONSE\_TO\_AMINE  
GOBP\_CATION\_TRANSMEMBRANE\_TRANSPORT  
GOBP\_REGULATION\_OF\_ANATOMICAL\_STRUCTURE\_SIZE  
GOBP\_AXON\_DEVELOPMENT  
GOBP\_NEURON\_RECOGNITION  
GOBP\_REGULATION\_OF\_CYCLASE\_ACTIVITY  
GOBP\_NEGATIVE\_CHEMOTAXIS  
GOBP\_VISUAL\_BEHAVIOR

term.size	n.genes.altered	n.enriched
628	41	7
195	41	5
980	41	8
1397	41	9
422	41	6
428	41	6
431	41	6
1975	41	10
1100	41	8
1672	41	9
136	41	4
318	41	5
957	41	7
1397	41	8
1004	41	7
53	41	3
406	41	5
723	41	6
446	41	5
1618	41	8
234	41	4
1730	41	8
860	41	6
1314	41	7
541	41	5
276	41	4
565	41	5
579	41	5
105	41	3
975	41	6
344	41	4
130	41	3
23	41	2
679	41	5
1602	41	7
1605	41	7
139	41	3
144	41	3
27	41	2
750	41	5
30	41	2
766	41	5
1216	41	6
167	41	3
32	41	2
178	41	3
844	41	5
39	41	2
484	41	4

202	41	3
42	41	2
886	41	5
493	41	4
507	41	4
46	41	2
46	41	2
46	41	2
47	41	2

genes.enriched	pct.enriched
ADGRB3 CARMIL1 CUX2 DSCAM FUT9 GRID2 LRRC4C	0,0111465
ADGRB3 ASIC2 CUX2 FLRT2 GRID2	0,02564103
ASIC2 GABRB1 GRID2 GRIN2A MDGA2 MEIS2 PCDH9 PRKG1	0,00816327
ADGRB3 ADGRV1 ASIC2 CUX2 DSCAM FLRT2 GRID2 MEIS2 NELL1	0,00644238
ADGRB3 ASIC2 CUX2 DSCAM FLRT2 GRID2	0,01421801
ADGRB3 CUX2 DSCAM FUT9 GRID2 LRRC4C	0,01401869
ASIC2 CUX2 GABRB1 GRID2 GRIN2A KCNQ3	0,01392111
CARMIL1 DSCAM FLRT2 FUT9 GRIN2A HDAC9 NRG1 PRKG1 PTPRK PTPRT	0,00506329
CARMIL1 FLRT2 FUT9 HDAC9 NRG1 PRKG1 PTPRK PTPRT	0,00727273
ASIC2 CUX2 GABRB1 GRID2 GRIN2A GRM7 KCNQ3 LRRC4C MYRIP	0,00538278
CUX2 GABRB1 GRID2 GRIN2A	0,02941176
ASIC2 EYS GRIN2A MEIS2 PTPRK	0,01572327
ADGRB3 ASIC2 CARMIL1 CUX2 FLRT2 GRID2 NRG1	0,00731452
ADGRB3 ADGRV1 ASIC2 CUX2 DSCAM FLRT2 GRID2 NELL1	0,00572656
ADGRB3 CARMIL1 CDH12 CUX2 DSCAM FLRT2 LRRC4C	0,00697211
GRID2 GRIN2A GRM7	0,05660377
CUX2 GRID2 GRIN2A GRM7 LRRC4C	0,01231527
ADGRB3 CARMIL1 CUX2 DSCAM FLRT2 LRRC4C	0,00829876
ASIC2 EYS GRIN2A MEIS2 PTPRK	0,01121076
ADGRV1 CARMIL1 CUX2 DSCAM HDAC9 MEIS2 NELL1 NRG1	0,00494438
ADGRB3 CUX2 DSCAM PRKG1	0,01709402
ASIC2 DPP10 GRIN2A GRM7 KCNQ3 KCNQ5 MYRIP NRG1	0,00462428
ASIC2 DPP10 GABRB1 GRIN2A KCNQ3 KCNQ5	0,00697674
ASIC2 DPP10 GRIN2A GRM7 KCNQ3 KCNQ5 MYRIP	0,00532725
ADGRB3 CUX2 DSCAM GRIN2A MEIS2	0,00924214
ADGRB3 CUX2 GRIN2A MEIS2	0,01449275
ASIC2 DPP10 GRIN2A KCNQ3 KCNQ5	0,00884956
ADGRB3 CUX2 DSCAM FLRT2 LRRC4C	0,00863558
CUX2 GRID2 GRIN2A	0,02857143
ADGRV1 ASIC2 EYS GRIN2A GRM7 NCAM2	0,00615385
CARMIL1 CUX2 DSCAM FUT9	0,01162791
ADGRB3 GRIN2A MEIS2	0,02307692
GRID2 GRIN2A	0,08695652
ADGRB3 CUX2 DSCAM FLRT2 LRRC4C	0,00736377
CARMIL1 FLRT2 FUT9 HDAC9 PRKG1 PTPRK PTPRT	0,00436954
ASIC2 DPP10 GABRB1 GRID2 GRIN2A KCNQ3 KCNQ5	0,00436137
ADGRB3 CUX2 DSCAM	0,02158273
ADGRV1 ASIC2 EYS	0,02083333
GRID2 GRIN2A	0,07407407
GRID2 GRIN2A MEIS2 PCDH9 PRKG1	0,00666667
GRIN2A HDAC9	0,06666667
ADGRB3 CUX2 DSCAM FLRT2 LRRC4C	0,00652742
ADGRV1 ASIC2 EYS GRIN2A MEIS2 PTPRK	0,00493421
ADGRV1 ASIC2 GRM7	0,01796407
ADGRV1 ASIC2	0,0625
GABRB1 GRID2 MDGA2	0,01685393
CARMIL1 CUX2 DSCAM NELL1 NRG1	0,00592417
ADGRV1 NELL1	0,05128205
CARMIL1 CUX2 DSCAM HDAC9	0,00826446

ADGRV1 ASIC2 MEIS2	0,01485149
GRIN2A HDAC9	0,04761905
ASIC2 DPP10 GRIN2A KCNQ3 KCNQ5	0,00564334
ASIC2 CARMIL1 DSCAM PRKG1	0,00811359
DSCAM FLRT2 LRRC4C NCAM2	0,00788955
DSCAM NCAM2	0,04347826
ADGRV1 GRM7	0,04347826
FLRT2 NRG1	0,04347826
GRIN2A MEIS2	0,04255319



pval	padj
3.2667406964	0,0001018
3.1387215708	0,0001018
4.5561331088	0,0001363
5.7455551158	0,00016527
6.0119025931	0,00016653
6.5257850178	0,00017431
6.7959148418	0,00017526
1.0997861947	0,00026533
1.0814075686	0,00026533
2.5217158293	0,00058937
3.0253397697	0,00068565
3.4601054366	0,00076112
5.2989186901	0,0011323
6.2963760685	0,00130807
7.2372343467	0,0014629
8.0817272992	0,00159061
1.1279468508	0,00216305
1.3149282511	0,00245859
1.7704394383	0,00322954
1.8199681836	0,00324084
2.5666085336	0,00446411
2.9341122139	0,00498732
3.4740219733	0,00577382
4.0582920865	0,00659825
4.4383629506	0,00706266
4.8787589551	0,00760172
5.4486850158	0,00831647
6.1150982865	0,00914696
6.3000734248	0,00923887
6.9529660721	0,01000024
0,00011412	0,01610374
0,00011873	0,01644436
0,00012853	0,01722211
0,00012895	0,01722211
0,00013983	0,01824002
0,00014145	0,01824002
0,0001447	0,01834275
0,0001606	0,02001916
0,00017798	0,02182192
0,00020448	0,02466568
0,00022027	0,02614965
0,00022538	0,02633774
0,00023084	0,02656066
0,00024834	0,02801077
0,00025093	0,02801077
0,0002994	0,03292956
0,0003516	0,03811003
0,00037368	0,03992474
0,00041781	0,04401085

0,0004332	0,04432879
0,00043359	0,04432879
0,00043861	0,04432879
0,00044776	0,04465015
0,00049735	0,04894296
0,00052026	0,04925377
0,00052026	0,04925377
0,00052026	0,04925377
0,00054314	0,05077647

Term	P-value	Adjusted P-val
glutamate receptor activity (GO:0008066)	7,61E-04	0,04938702
calcium channel regulator activity (GO:0005246)	0,00129163	0,04938702
delayed rectifier potassium channel activity (GO:0005251)	0,00160728	0,04938702
transmitter-gated ion channel activity (GO:0022824)	0,00207945	0,04938702

Odds Ratio	Combined Sco	Genes
56,8119658	407,959182	GRID2;GRM7
42,5961538	283,343157	GRM7;PRKG1
37,8575499	243,545557	KCNQ3;KCNQ5
32,9660877	203,587028	GABRB1;GRID2

term  
KEGG\_NEUROACTIVE\_LIGAND\_RECEPTOR\_INTERACTION

term.size  
272

n.genes.altered	n.enriched	genes.enriched	pct.enriched	pval	padj
41	4	GABRB1 GRID2 GRIN2A GRM7	0,01470588	4.6101645783	0,00857491

**Supplementary Fig. 8. Decreased APP/ $\beta$ -CTF levels in *BIN1* KO cerebral organoids. (a)** Immunoblot for APP C-terminal and ACTIN in 190-day-old *BIN1* WT and KO cerebral organoids. Bands corresponding to the full-length product (110 kDa) and the C-terminal fragment (10 kDa) are indicated. **(b)** Graphs showing the quantifications of the ratios:  $\beta$ -CTF/ $\beta$ -ACTIN,  $\beta$ -CTF/full-length APP, and full-length APP/ $\beta$ -ACTIN normalized to WT (\* $p=0.0177$ ; \*\* $p=0.0034$ ; Unpaired t-test; N = 5 organoids/genotype). **(c)** Immunoblot similar to (a) for 6-week-old 2D cell cultures. **(d)** Quantifications of the ratios:  $\beta$ -CTF/ $\beta$ -ACTIN,  $\beta$ -CTF/full-length APP, and full-length APP/ $\beta$ -ACTIN (# $p=0.0867$ ; Unpaired t-test; N=4 independent cell cultures).

