



HAL
open science

Implications de la signalisation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans les dysfonctions mitochondriales, la pathologie amyloïde et Tau, et la neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer

Arnaud Mary

► To cite this version:

Arnaud Mary. Implications de la signalisation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans les dysfonctions mitochondriales, la pathologie amyloïde et Tau, et la neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer. Biologie cellulaire. Université Côte d'Azur, 2022. Français. NNT : 2022COAZ6001 . tel-04368438

HAL Id: tel-04368438

<https://theses.hal.science/tel-04368438>

Submitted on 1 Jan 2024

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

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

THÈSE DE DOCTORAT

Implications de la signalisation de la protéine kinase
activée par l'AMP (AMPK) dans les dysfonctions
mitochondriales, la pathologie amyloïde et Tau, et la
neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer

Arnaud MARY

Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC)

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

Dirigée par : **Dr. Mounia CHAMI**
et **Dr. Valérie BUEE-SCHERRER**
Soutenue le : 25 janvier 2022

Devant le jury, composé de :

Dr. Frédéric CHECLER, Président, IPMC,
Sophia Antipolis

Dr. Chantal MATHIS, Rapportrice, LNCA,
Strasbourg

Dr. Gilles BONVENTO, Rapporteur, LMN,
Fontenay-aux-Roses

Dr. Hélène HIRBEC, Examinatrice, IGF,
Montpellier

Dr. Frédéric BOST, Examineur, C3M, Nice

Dr. Mounia CHAMI, Directrice de thèse, IPMC,
Sophia Antipolis

Dr. Valérie BUEE-SCHERRER, Co-directrice,
Université de Lille, Lille

Implication de la signalisation de la protéine kinase activée par l'AMP (AMPK) dans les dysfonctions mitochondriales, la pathologie amyloïde et Tau, et la neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer.

Arnaud MARY

Composition du jury :

Président du jury :

- ❖ Dr. Frédéric CHECLER, DRCE INSERM, Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), UMR7275, Sophia Antipolis.

Rapporteurs :

- ❖ Dr. Chantal MATHIS, DR2 CNRS, Laboratoire de Neurosciences Cognitives et Adaptatives (LNCA), UMR7364, Strasbourg.
- ❖ Dr. Gilles BONVENTO, DR2 INSERM, Laboratoire des Maladies Neurodégénératives (LMN), UMR9199, Fontenay-aux-Roses.

Examineurs :

- ❖ Dr. Hélène HIRBEC, CRCN CNRS (HDR), Institut de Génomique Fonctionnelle, UMR5203, Montpellier.
- ❖ Dr. Frédéric BOST, DR2 CNRS, Centre Méditerranéen de Médecine Moléculaire (C3M), INSERM U1065, Nice.

Directrice de thèse :

- ❖ Dr. Mounia CHAMI, CRCN INSERM (HDR), Institut de Pharmacologie Moléculaire et Cellulaire (IPMC), UMR7275, Sophia Antipolis.

Co-directrice de thèse :

- ❖ Dr. Valérie BUEE-SCHERRER, Maître de conférences (HDR), Lille Neurosciences et Cognition, Université Lille, Lille.

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la pathologie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. L'échec des traitements ciblant l'amyloïde beta ($A\beta$), un catabolite de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), souligne le caractère multifactoriel de cette pathologie. Ainsi, les défauts précoces de la structure et de la fonction des mitochondries et la neuroinflammation sont impliqués dans le développement de la MA. Différentes études décrivent l'AMPK (AMP-activated protein kinase) comme étant un acteur majeur de l'homéostasie mitochondriale notamment via l'élimination des mitochondries altérées par mitophagie et dans la régulation de la neuroinflammation.

L'hypothèse centrale de mon projet postule qu'outre le peptide $A\beta$, d'autres catabolites de l'APP, les fragments C-terminaux (APP-CTFs) peuvent contribuer aux dysfonctions mitochondriales et aux défauts de la mitophagie, et que la modulation de l'AMPK pourrait avoir un impact bénéfique dans le contexte de la MA.

Ma thèse est structurée en deux objectifs spécifiques :

Axe 1. Etude de la contribution des APP-CTFs dans les défauts de la structure et de la fonction des mitochondries et de la mitophagie dans la MA. Nous avons observé une accumulation des APP-CTFs dans la mitochondrie des cellules de neuroblastomes humains exprimant de façon stable l'APP portant la double mutation suédoise (SH-SY5Y-APP^{swe}), ou le fragment APP-CTF β : C99 (SH-SY5Y-C99) entraînant une altération de la morphologie des mitochondries, une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS_{mit}) et un blocage de la mitophagie. Ces effets toxiques ont été confirmés chez les souris présymptomatiques 3xTgAD (APP^{swe}, TauP301L, PS1 (M146V)) et des souris exprimant le fragment C99 par une approche virale, et sont exacerbés (*in vitro* et *in vivo*) suite à l'inhibition de la γ -sécrétase, bloquant la production du peptide $A\beta$ et accumulant les APP-CTFs. Enfin, l'analyse des nécropsies de cerveaux de patients humains diagnostiqués avec une forme sporadique de la MA, a montré une accumulation des APP-CTFs dans les mitochondries, corrélant avec un défaut du processus mitophagique. Ainsi, cibler l'accumulation précoce de ces APP-CTFs et la dysfonction mitochondriale pourraient représenter de nouvelles cibles thérapeutiques dans le contexte de la MA^{1,2,3}.

Axe 2. Etude de l'impact de la modulation de la cascade de signalisation de l'AMPK dans le contexte de la MA. Nous avons observé une répression de la cascade AMPK-ULK1 dans les nécropsies de lobes temporaux de patients Alzheimer sporadiques, dans les modèles d'étude de la MA *in vitro* (SH-SY5Y-APP^{swe} et SH-SY5Y-C99), et chez les souris symptomatiques 3xTgAD. Nous avons démontré que l'inhibition pharmacologique de l'AMPK augmente l'accumulation des APP-CTFs, exacerbe les défauts de la structure des mitochondries, provoque une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et une augmentation de la production de ROS_{mit}, et inhibe la mitophagie dans les modèles *in vitro*. L'inhibition pharmacologique de l'AMPK affecte également la maturation des épines dendritiques *ex vivo* (coupes organotypiques d'hippocampes exprimant l'APP^{swe} par une approche virale). A l'inverse, l'activation pharmacologique de l'AMPK permet de réduire le dysfonctionnement mitochondrial (*in vitro*), de favoriser la maturation des épines dendritiques (*ex vivo*). Nous avons confirmé ces observations par une approche génétique en exprimant des constructions AMPK mutées (formes constitutive active et dominante-négative). De façon importante, l'activation pharmacologique de l'AMPK *in vivo* a permis de réduire la pathologie $A\beta$ et Tau, ainsi que la neuroinflammation et les défauts d'apprentissage chez les souris 3xTgAD symptomatiques. Ainsi, la stimulation de l'AMPK pourrait représenter une nouvelle piste thérapeutique réduisant plusieurs paradigmes associés à la MA⁴.

1. Vaillant-Beuchot L.*, Mary A.* *et al.* Acta Neuropathologica 2020.
2. Mary A.*, Vaillant-Beuchot L.* *et al.* Médecine/sciences 2021.
3. Mary A. *et al.* Revue en révision, Molecular Psychiatry.
4. Mary A. *et al.* Article en préparation.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, AMPK, APP-CTFs, mitochondries, mitophagie, neuroinflammation.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease in the world. Failures of candidate treatments targeting the beta amyloid (A β), a catabolite originating from the amyloid precursor protein (APP), highlight the multifactorial nature of this pathology. Hence, the early defects of mitochondrial structure and functions, and the neuroinflammation are implicated in AD development. Several studies describe the AMPK (AMP-activated protein kinase) as a master regulator of mitochondrial homeostasis, notably via the elimination of damaged mitochondria by mitophagy, and also of neuroinflammation.

The central hypothesis of my thesis postulates that, besides the A β peptide, other APP catabolites, the C-terminals fragments (APP-CTFs) can contribute to mitochondrial dysfunctions and that the modulation of the AMPK could hold beneficial effects in AD.

My thesis is structured into two specific objectives:

Axe 1. Study of the APP-CTFs contribution to the alterations of mitochondria structure, functions, and mitophagy in AD. We have observed an accumulation of APP-CTFs in mitochondria of human neuroblastoma cells stably expressing APP with the double Swedish mutation (SH-SY5Y-APP^{Swe}), or the APP- β CTF: C99 (SH-SY5Y-C99), causing an alteration of mitochondria morphology, an increase reactive oxygen species (ROS_{mit}) production, and a blockade of mitophagy. These toxic effects were confirmed in presymptomatic 3xTgAD mice (APP^{Swe}, TauP301L, PS1 (M146V)) and in mice expressing the C99 fragment via a lentiviral approach and were exacerbated (*in vitro* and *in vivo*) following the inhibition of the γ -secretase, blocking the A β production and accumulating APP-CTFs. Finally, we have reported a mitochondrial accumulation of APP-CTFs in the temporal lobes necropsies of sporadic AD patients correlating with a defective mitophagic phenotype. Hence, targeting the early APP-CTFs accumulation and mitochondrial dysfunctions could constitute promising novel therapeutic targets in the AD context^{1,2,3}.

Axe 2. Study of the impact of AMPK signaling cascade modulation in AD. We have observed a defective AMPK-ULK1 cascade in the temporal lobes necropsies of sporadic AD patients, in *in vitro* AD study models (SH-SY5Y-APP^{Swe} and -C99) and in symptomatic 3xTgAD mice. Afterward, we have demonstrated that the pharmacological inhibition of AMPK enhances APP-CTFs accumulation, worsen mitochondria structure alterations, triggers mitochondria membrane hyperpolarization, increases ROS_{mit} production, and inhibits mitophagy *in vitro*. Pharmacological AMPK blockade also alters the dendritic spine maturation *ex vivo* (organotypic hippocampal slices lentivirally expressing APP^{Swe}). Oppositely, the pharmacological activation of AMPK alleviates mitochondria dysfunctions *in vitro* and favors the dendritic spine maturation *ex vivo*. We confirmed these observations using a genetic approach by expressing mutated AMPK constructs (constitutive active and dominant negative forms). Importantly, pharmacological activation of AMPK reduces A β and Tau pathologies, as well as neuroinflammation and learning impairments in symptomatic 3xTgAD mice. Overall, the stimulation of AMPK could stand as a new therapeutic avenue to alleviate AD pathogenesis⁴.

1. Vaillant-Beuchot L.*, Mary A.* *et al.* Acta Neuropathologica 2020.

2. Mary A.*, Vaillant-Beuchot L.* *et al.* Médecine/sciences 2021.

3. Mary A. *et al.* Review under review, Molecular Psychiatry.

4. Mary A. *et al.* Article in preparation.

Key words: Alzheimer's disease, AMPK, APP-CTFs, mitochondria, mitophagy, neuroinflammation.

Publications et communications

ARTICLES



Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy effects in Alzheimer's disease models and human brains.

Loan Vaillant-Beuchot*, **Arnaud Mary***, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Alexandre Bourgeois, Inger Lauritzen, Fanny Eysert, Paula Fernanda Kinoshita, Julie Cazareth, Céline Badot, Konstantina Fragaki, Renaud Bussiere, Cécile Martin, Rosanna Mary, Charlotte Bauer, Sophie Pagnotta, Véronique Paquis-Flucklinger, Valérie Buee-Scherrer, Luc Buée, Sandra Lacas-Gervais, Frédéric Checler, Mounia Chami. (* co-premiers auteurs). **Acta Neuropathologica** Received: 9 June 2020 / Revised: 3 September 2020 / Accepted: 1 October 2020, <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02234-7>.



Hampered AMPK-ULK1 cascade instigates mitochondrial dysfunctions, mitophagy and neuroinflammation in Alzheimer's disease.

Arnaud Mary, Paula Fernanda Kinoshita, Fanny Eysert, Audrey Valverde, Sandra Lacas-Gervais, Charlotte Bauer, Sabiha Eddarkaoui, Anne-Sophie Gay, Delphine Debayle, Luc Buée, Valérie Buée-Scherrer, Frédéric Checler, Mounia Chami. **Travail en cours de soumission.**



Upregulation of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 1 Truncated Isoform Plays a Pathogenic Role in Alzheimer's Disease.

Renaud Bussiere, Bénédicte Oulès, **Arnaud Mary**, Loan Vaillant-Beuchot, Cécile Martin, Wejdane El Manaa, Déborah Vallée, Eric Duplan, Patrizia Paterlini-Bréchot, Cristine Alves Da Costa, Frédéric Checler, Mounia Chami. **Cells**. 2019 Nov 28;8(12):1539. doi: 10.3390/cells8121539.

REVUES



Dysfonction mitochondriale et défaillance de la mitophagie dans la maladie d'Alzheimer.

Arnaud Mary*, Loan Vaillant-Beuchot*, Frédéric Checler, Mounia Chami. (* co-premiers auteurs). **Med Sci (Paris)**. 2021 Oct;37(10):843-847. doi: 10.1051/medsci/2021133.



Mitophagy in Alzheimer's disease: molecular defects and therapeutic approaches.

Arnaud Mary, Fanny Eysert, Frédéric Checler, Mounia Chami. **Travail en révision, Mol Psychiatry.**



Molecular Dysfunctions of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) in Alzheimer's Disease.

Fanny Eysert*, Paula Fernanda Kinoshita*, **Arnaud Mary**, Loan Vaillant-Beuchot, Frédéric Checler, Mounia Chami. (* co-premiers auteurs). **Int J Mol Sci.** 2020 Dec 14;21(24):9521. doi: 10.3390/ijms21249521.

COMMUNICATIONS



Semaine du Cerveau en Côte d'Azur (mars 2018) – Animation du stand « Goût ».



Fête de la science (septembre 2018) – Animation de l'atelier « Modèle Drosophile ».



Congrès « 9th World Congress on Targeting Mitochondria », à Berlin, Allemagne (octobre 2018) – Présentation orale de mon encadrante, Dr. Mounia CHAMI.



Semaine du Cerveau en Côte d'Azur (mars 2019) – Animation du stand « Perception Visuelle et Couleurs ».



Journées de l'ED85 SVS (mai 2019) – Présentation du poster : « Role of AMPK in mitochondrial dysfunctions and neuroinflammation in Alzheimer disease ».



30 ans de l'IPMC « Du Don à la Découverte...et aux Médicaments ! » (novembre 2019) – Présentation du poster : « Maladie d'Alzheimer : nouveaux mécanismes et thérapies potentielles ».



15th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PDTM 2021) (mars 2021) – Présentation orale (virtuelle) N°337: "Pathogenic Vs. therapeutic facets of the AMPK signaling cascade in mitochondrial dysfunctions and neuroinflammation in Alzheimer's disease (AD)".



16th International Conference on Alzheimer's & Parkinson's Diseases (AD/PDTM 2021) à Barcelone, Espagne (mars 2022) – Présentation du poster N°035: "Targeting the AMPK signaling cascade to rescue mitochondrial dysfunctions, mitophagy and neuroinflammation in Alzheimer's disease".

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury, les rapporteurs Dr. Chantal MATHIS et Dr. Gilles BONVENTO et les examinateurs Dr. Hélène HIRBEC et Dr. Frédéric BOST pour avoir accepté de prendre de leur temps pour évaluer mon travail de thèse.

Je tiens ensuite à remercier le Dr. Frédéric CHECLER pour m'avoir accueilli dans son équipe, ainsi que pour avoir accepté d'être le président de mon jury de thèse.

Je remercie bien sûr la Dr. Mounia CHAMI, ma directrice de thèse, qui m'a fait la joie de me recruter puis de m'encadrer durant les 4 années qui ont suivis. Merci pour ton implication irréprochable dans ma formation, pour tous tes conseils et tous ce que tu m'as permis d'apprendre et d'entreprendre au cours de cette thèse. J'espère te laisser une aussi bonne impression en tant que doctorant que toi en tant que ma directrice.

Mes remerciements vont aussi aux autres membres de la Team CHECLER, Inger, Raphaëlle, Charlotte, Eric, Julie et Cristine, pour m'avoir bien accueilli dans leur équipe, pour leur aide, leurs conseils et pour les diverses discussions scientifiques ou amicales que l'on a pu avoir. Je remercie Corinne KALFA pour sa gestion de notre grosse équipe.

Merci également aux différents étudiants, doctorants et post-docs, passés et présents de l'équipe. Merci à mes premiers voisins de bureau, et maintenant docteurs, Renaud et Anaïs, pour m'avoir très bien accueilli dans la Team, pour tous ce que vous m'avez montré au labo, et pour toutes nos activités et soirées en dehors. Je vous souhaite le meilleur pour votre avenir.

Merci à d'autres « anciens » doctorants : Alexandre, Wejdane et Lila pour votre accueil et pour les jeux auxquels on a joué et les soirées qu'on a passé ensemble. Je vous souhaite des heureuses carrières également.

Merci à Lígia et Elissa pour votre constante bonne humeur. Merci à Paula pour ton énergie, tes chansons, les conversations culinaires (j'ai pas mal appris sur la cuisine brésilienne), et pour les longues manips Calcium.

Aux nouveaux doctorants de l'équipe, Céline et Julien, je vous souhaite que vos thèses se passent le mieux possible, avec le moins de problèmes.

Merci à Aurore pour être aussi dynamique et impliquée dans la vie du labo. Merci aussi pour tout ce que tu as pu organiser et pour les activités en dehors du labo, continue à gérer comme ça !

Merci à mes incroyables voisins de bureau, Loan et Fanny (la meilleure, quelqu'un m'a dit...). Loan, je suis très content d'avoir un voisin de bureau et de paillasse comme toi. Merci pour ton humour, ton aide et tes conseils sur tous les sujets, et pour m'avoir supporté tout au long de ma thèse. Merci pour tout l'extra-travail aussi bien sûr. Je te souhaite une bonne fin de thèse.

Fanny, merci beaucoup pour te gentillesse, ton humour et pour être toujours à l'écoute. J'ai fini par bien aimé toutes tes histoires, tes 3615 My Life, et tes expressions... très personnelles. Merci aussi bien sûr pour tout l'extra travail, pour les soirées à votre appartement, et merci pour ta relecture originale de mon manuscrit.

Un gros merci impossible à oublier à la Dr. Audrey VALVERDE. Merci Audrey pour ces années de bonne humeur et d'accent chantant, pour le nombre incalculable de fois où tu m'as aidé. Merci pour toutes les techniques et astuces que tu m'as montrés et appris au labo. Merci pour tous tes conseils, du début de ma thèse jusqu'à aujourd'hui. Merci aussi pour tous les jeux que l'ont à fait (et non, je ne suis

toujours pas mauvais perdant), pour les soirées, qui étaient parfois des soirées-jeux, justement, avec pleins de monde (et même parfois des moustiques...), et pour les belles balades que tu nous proposais. Merci beaucoup, je te souhaite de continuer à t'éclater dans ta vie.

Je remercie également à l'institut tous ceux qui gèrent la plateforme de microscopie (Frédéric BRAU et Sophie ABELANET), la cytométrie (Julie CAZARETH), la plateforme de protéomique (Anne-Sophie GAY, Delphine DEBAYLE), les animaleries, et la plateforme microscopie électronique de l'UCA (Sandra LACAS-GERVAIS).

Même si finalement, les événements n'ont pas abouti en un séjour Lillois pour moi, je tiens quand même à remercier l'équipe du Dr. Luc BUEE, et notamment la Dr. Valérie VINGTDEUX pour l'envoi des plasmides des constructions AMPK mutants, l'IE Sabiha EDDARKAOUI pour les ELISA pTau sur mes échantillons, et les Dr. Luc BUEE et Valérie BUEE-SCHERRER pour leur participation à mes comités de thèse.

Merci également à la Dr. Agnès MARTIN. Merci Agnès pour toutes nos conversations, bon courage pour tes études et ta future carrière.

Je tiens à remercier ceux sans qui je ne serais pas là : mes parents, bien sûr ! Merci pour votre soutien indéfectible tout au long de mon parcours, je pense vraiment avoir de la chance de vous avoir eu (ou alors est-ce l'inverse ?). Merci à ma super (grande) sœur Lauriane, ainsi qu'à Quentin (et Cyclope aussi ?), et plus largement toute ma famille, mes cousins/cousines, oncles et tantes, et ma grand-mère.

Au risque d'oublier des personnes, j'adresse enfin mes remerciements à toutes les personnes qui, de près ou de loin, m'ont aidé à mener à bien ma thèse !

« Ce n'est pas le chemin qui est difficile, c'est le difficile qui est le chemin. »

Sören Kierkegaard

Sommaire

Résumé.....	2
Abstract	3
Publications et communications.....	4
Remerciements.....	6
Sommaire	8
Liste des tableaux et des figures.....	12
Abréviations	14
Introduction	18
La maladie d'Alzheimer.....	18
A) Généralités.....	18
1) Données cliniques.....	19
a) Symptômes comportementaux et tests neuropsychologiques	19
b) Marqueurs histopathologiques.....	19
c) Le diagnostic à l'ère des biomarqueurs	22
2) Données thérapeutiques.....	27
a) Thérapies disponibles	27
b) Traitements en cours d'essai clinique.....	27
B) Les différentes formes de la MA	29
1) Mutations autosomiques dominantes et formes familiales.....	29
a) Mutations du gène de l'APP.....	29
b) Mutations des gènes des présénilines	30
2) Formes sporadiques et facteurs de risques	30
a) Facteurs de risques génétiques	30
b) Facteurs de risques non-génétiques	33
3) Dysfonctions moléculaires de la MA	34
a) Dysfonctions synaptiques.....	34
b) Neuroinflammation chronique.....	35
C) Le métabolisme de l'APP.....	37
1) Voie non-amyloïdogène	38
2) Voie amyloïdogène.....	39
3) Voies de clivages non-canoniques.....	40
4) Les métabolites de l'APP : fonctions physiologiques et toxicités.....	42
a) Les fragments APPs- α et APPs- β	42
b) Les fragments APP-CTFs (C83 et C99).....	42
c) L'A β et le P3	43

d) L'AICD	43
Pathologie mitochondriale dans la MA	45
A) Les fonctions physiologiques de la mitochondrie	45
1) Structure des mitochondries	45
2) Fonctions physiologiques des mitochondries	45
B) Dysfonctions mitochondriales dans le contexte de la MA	48
La mitophagie : description physiologique et dysfonctions dans la MA	52
A) Rôle physiologique de la mitophagie	52
1) Description du processus et fonctions	52
2) Les différents types de mitophagies et leur description moléculaire.....	54
a) La formation du phagophore	54
b) Mitophagie PINK1/Parkine-dépendante	55
c) Mitophagie PINK1/Parkine-indépendante	58
d) La fusion avec le lysosome et la dégradation par les hydrolases	59
B) Dysfonctions de la mitophagie dans la MA	60
1) Chez les patients Alzheimer	61
a) Etude de nécropsies de cerveaux.....	61
b) Etude de tissus périphériques	63
2) Mitophagie dans les modèles d'étude <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de la MA	66
a) Contribution de Tau.....	66
b) Contribution de l'A β	68
c) Contribution d'APOE4 et du cholestérol	70
Le complexe AMPK : senseur et régulateur clé de l'homéostasie des cellules.....	74
A) Structure et activation de l'AMPK.....	74
1) Structure du complexe AMPK	74
2) Modulation de l'activité de l'AMPK.....	76
a) Régulations physiologiques de l'AMPK.....	76
b) Modulations pharmacologiques de l'AMPK.....	79
B) Régulation du métabolisme par l'AMPK	80
1) Inhibition des voies anaboliques	81
2) Stimulation des voies cataboliques.....	81
C) L'AMPK et les mitochondries	83
1) Stimulation de la biogenèse mitochondriale.....	83
2) Régulation de la dynamique mitochondriale.....	84
3) Régulation de la macroautophagie et mitophagie	84
D) Actions anti-inflammatoires de l'AMPK	85
1) Inhibition des cascades de signalisations pro-inflammatoires.....	85

2) Modulation du métabolisme et de la différenciation des cellules immunitaires	86
3) Modulation de la neuro-inflammation.....	87
PROJET DE THÈSE	89
MODÈLES ET TECHNIQUES D'ÉTUDE.....	90
RESULTATS PARTIE I.....	93
Article 1.....	93
Résumé des résultats	94
RESULTATS PARTIE II.....	145
Article 2.....	145
Résumé des résultats	146
Discussion de la partie I.....	188
A) Les APP-CTFs s'accumulent au niveau des mitochondries dans la MA	188
B) L'accumulation des APP-CTFs provoque des défauts de structure et de fonctionnement des mitochondries	188
C) L'accumulation des APP-CTFs provoque un blocage de l'autophagie et de la mitophagie	189
D) Cibler l'accumulation des APP-CTFs et les dysfonctions mitochondriales comme stratégie thérapeutique contre la MA.....	191
1) Stratégies de modulation de la production des APP-CTFs.....	191
2) Stratégies de stimulation de la dégradation des APP-CTFs	193
3) Stratégies de stimulation pharmacologique de la mitophagie	194
Discussion de la partie II.....	199
A) Quel est l'état de la signalisation AMPK dans la MA ?.....	199
B) Quels sont les impacts de la modulation de la signalisation AMPK dans la MA ?.....	199
1) Impacts de l'inhibition de l'AMPK.....	199
2) Impacts de la stimulation de l'AMPK.....	200
a) Métabolisme de l'APP.....	200
b) Pathologie Tau.....	201
a) Structure et fonctions des mitochondries.....	202
b) Réponse inflammatoire centrale et périphérique	202
c) Pathologie synaptique et cognition.....	203
C) Le ciblage de la signalisation AMPK comme stratégie thérapeutique contre la MA.....	203
1) Peut-on cibler les cellules défaillantes ?.....	203
2) Peut-on améliorer la biodisponibilité et l'efficacité de la MET ?	204
3) Quelle pourrait être la fenêtre d'intervention thérapeutique de la MET ?.....	204
Conclusions et perspectives générales.....	206
A) Quels sont les mécanismes moléculaires des dysfonctions dues à l'accumulation des APP-CTFs ?	206
B) Quels sont les impacts des différents APP-CTFs ?	207

C) Validation des approches pharmacologiques de modulation de l'AMPK.....	207
D) Optimisation du traitement <i>in vivo</i> avec la MET.....	207
E) Compréhension des mécanismes d'actions de la MET dans un cerveau de malade Alzheimer 207	
Références bibliographiques	208
Annexe 1	232
Annexe 2	238
Annexe 3	263
Annexe 4	294

Liste des tableaux et des figures

Tableau 1 : Liste et fonctions des variants génétiques associés aux formes sporadiques de la MA.	32
Tableau 2 : Altérations du processus mitophagique par l'étude de nécropsies de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer sporadique.	63
Tableau 3 : Altérations du processus mitophagique dans les tissus périphériques de patients atteints de la maladie d'Alzheimer.	66
Tableau 4 : Impacts de différentes formes de Tau sur la mitophagie dans les modèles d'études de la MA.	68
Tableau 5 : Rôle des différentes formes de l'A β sur la mitophagie dans les modèles d'études de la MA.	70
Tableau 6 : Impacts de l'APOE4 et du cholestérol sur la mitophagie dans les modèles d'études de la MA.	72
Tableau 7 : Essais cliniques de molécules activatrices de la mitophagie chez des sujets âgés ou MA.	198
Figure 1 : Le continuum des phases de la MA.	18
Figure 2 : Structure des domaines de la protéine Tau et formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) associées à l'accumulation des protéines Tau hyperphosphorylées.	20
Figure 3 : Les deux marqueurs histopathologiques de la MA : Les plaques séniles extracellulaires et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) intraneuronales.	21
Figure 4 : Altérations anatomiques cérébrales dans la MA.	21
Figure 5 : Propagation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) dans la MA.	22
Figure 6 : Classification A/N/T : signification des termes et techniques d'évaluation des biomarqueurs.	24
Figure 7 : Evolution temporelle des niveaux de biomarqueurs et des symptômes cliniques.	25
Figure 8 : Deux propositions de classifications des sous-types de la MA.	26
Figure 9 : Mécanisme d'action de l'anticorps Aducanumab.	27
Figure 10 : Liste des facteurs de risque modifiables et facteurs de risque dépendants du sexe.	34
Figure 11 : Les modifications phénotypiques des microglies activées et la cinétique de la microgliose au cours de la progression de la MA.	36
Figure 12 : Structures des membres de la famille des protéines APP.	38
Figure 13 : Les deux voies de clivages canoniques de l'APP : la voie non-amyloïdogène et la voie amyloïdogène.	40
Figure 14 : Les voies de clivages non-canoniques de l'APP.	41
Figure 15 : Les principales fonctions physiologiques des mitochondries.	47
Figure 16 : Les principales dysfonctions mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer (MA).	51
Figure 17 : Les étapes de la mitophagie.	52
Figure 18 : Les trois grandes fonctions physiologiques de la mitophagie.	53
Figure 19 : Aperçu des complexes impliqués dans la formation du phagophore.	55
Figure 20 : Stabilisation de PINK1 à la surface de la mitochondrie endommagée et activation de la voie PINK1/Parkine.	57
Figure 21 : Les deux types de mitophagies.	59
Figure 22 : Acteurs de la fusion du mitophagosome avec le lysosome et formation du mitolysosome.	60
Figure 23 : Impacts des acteurs de la MA sur les étapes de la mitophagie dans les modèles d'études.	73
Figure 24 : Structure d'un complexe AMPK $\alpha_1\beta_2\gamma_1$ humain et schéma des différentes isoformes des sous-unités avec leurs domaines connus.	76

Figure 25 : Activation du complexe AMPK par la détection de la baisse des niveaux de fructose-1,6-biphosphate.....	78
Figure 26 : La régulation de l'activité du complexe AMPK.	80
Figure 27 : Aperçu de la régulation du métabolisme de la cellule par l'AMPK.	80
Figure 28 : La régulation du métabolisme par l'AMPK.....	82
Figure 29 : La régulation de l'homéostasie mitochondriale par l'AMPK.	83
Figure 30 : La régulation de la mitophagie par l'AMPK.	85
Figure 31 : Inhibition de cascades de signalisations pro-inflammatoires par l'AMPK.....	86
Figure 32 : Schéma récapitulatif de l'impact de l'accumulation des APP-CTFs sur l'homéostasie mitochondriale dans nos modèles d'étude de la MA.....	191
Figure 33 : Stratégies de modulation de la voie amyloïdogène en ciblant les activités des β et γ -sécrétases.....	192

Abréviations

2xTgAD : souris double transgéniques (APP^{swe} : KM670/671NL, TauP301L)
3xTgAD : souris triple transgéniques (APP^{swe}, TauP301L et PS1 (M146V))
5xFAD : souris quintuple transgéniques (APP^{swe}, Florida (I716V), et London (V717I), et PS1 (M146L) (L286V))
8-OHdG : 8-hydroxyguanine
A1/2 : astrocyte activé de type 1/2
AAV : adeno-associated virus
AC : actinonine
ACC1/2 : acetyl-CoA carboxylase 1/2
AcD : acidic domain
ADaM : allosteric drug and metabolite
ADAM : A disintegrin and metalloprotease
ADAS-Cog : alzheimer's disease assessment scale-cognitive
ADCS-ADL : alzheimer's disease cooperative study-activities of daily living scale
ADNg/mit : ADN génomique / mitochondrial
AEP : asparagine endopeptidase
AG : acide gras
AICAR : 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide
AICD : APP intracellular domain
AIF : apoptosis inducing factor
Akt : protein kinase B
Aldo : aldolase
AMBRA1 : activating molecule in Beclin1-regulated autophagy-1
AMP/ADP/ATP : adénosine mono/di/tri phosphate
AMPA : α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid
AMPK : AMP-activated protein kinase
A η - α/β : fragments soluble de la voie η -sécrétase
ANT : adenine nucleotide translocase
APAF-1 : apoptotic peptidase activating factor 1
APH-1 : anterior pharynx defective-1
APLP1/2 : amyloid precursor-like protein 1/2
APOE : apolipoprotéine E
APP : amyloid precursor protein
APP-CTFs : amyloid precursor protein C-terminal fragments
APP/PS1 : souris APP^{swe}/PS1 Δ E9

APPs : fragment APP soluble
ARIH1 : ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1
ARNm/r : ARN messenger/ ribosomique
ATG : autophagy-related protein
ATGL : adipose triglyceride lipase
BACE-1 : beta-site APP cleaving enzyme 1
BAP31 : B-cell receptor-associated protein 31
Bcl-1 : beclin 1
BCL2L13 : Bcl-2 like 13
BHE : barrière hématoencéphalique
BNIP3 : Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa interacting protein 3
BV2 : lignée de cellules microgliales murines
C. elegans : *Caenorhabditis elegans*
C1q : complément component 1q
C2C12 : lignée cellulaire de myoblastes murins
C31, C83/CTF α , C89/CTF β ' , C99/CTF β : amyloid precursor protein C-terminal fragments
CA1 : corne d'ammon
CaMKK β : Ca²⁺ / calmodulin-dependent protein kinase kinase β
CAPPD : central APP domain
CB2R : type-2 cannabinoid receptor
CBS : cystathionine- β -synthase
CC : compound C / Dorsomorphine
CCCP : carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone
CCL1/5 : C-C motif chemokine ligand 1/5
CD4/8/33 : cluster of differentiation 4/8/33
CDR : clinical dementia rating
CDR-SOB : clinical dementia rating-sum of boxes
CEBPB : CCAAT/enhancer-binding protein beta
CHOP : C/EBP homologous protein
ChREBP : carbohydrate-responsive element binding protein
CIBIC-Plus : clinician's interview-based impression of change plus caregiver input
CK1 γ 2 : casein kinase 1 γ 2
CL : cardiolipine
CLEAR : coordinated lysosomal expression and regulation
CNS : central nervous system
CPT : carnitine O-palmitoyltransférase
CREB : C-AMP response element-binding protein
CRISPR/Cas9 : clustered regularly interspaced short palindromic repeats / CRISPR associated protein 9

CRM : chaîne respiratoire mitochondriale
CRTC2 : CREB regulated transcription coactivator 2
CSN : cellules souches neurales
CXCL1 : C-X-C Motif Chemokine Ligand 1
Cyp-D : cyclophiline D
Cyt-C : cytochrome C
DAM : disease-associated microglia
DAMPs/PAMPs : danger or pathogen associated molecular patterns
DFT : démence fronto-temporal
DISC1 : disrupted-in-schizophrenia-1
Dkk1 : dickkopf-1
DNF : dégénérescences neurofibrillaires
DRP1 : dynamin-related protein 1
DT2 : diabète de type 2
ED : extension domain
eEF2K : eukaryotic elongation factor 2 kinase
EIM : espace inter-membranaire
ELISA : enzyme-linked immunosorbent assay
EP : exercice physique
EPG5 : ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog
ERRs : estrogen-related receptors
FADH₂ : flavine adénine dinucléotide réduite
FBP : fructose-1,6-biphosphate
FDA : USA Food & Drug Administration
FDG : fluorodésoxyglucose
FIP200 : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
Fis1 : mitochondrial fission protein 1
FKBP8 : FK506-binding protein 8
FOXO3a : forkhead box protein O3a
FUNDC1 : FUN14 Domain Containing 1
GABAB : gamma-aminobutyric acid type B
GFAP : glial fibrillary acidic protein
GFAT1 : glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase 1
GLUT1/4 : glucose transporter 1/4
GP : glutathion peroxydase
Gp78 : glycoprotéine 78
GR : glutathion réductase
GSH : glutathion réduit
GSK3 α/β : glycogen synthase kinase-3 α/β
GSSG : glutathion oxydé
GWAS : genome-wide association study
GYS1/2 : glycogen synthases 1 et 2
hAPP : human APP
HAS : haute autorité de santé
HDAC : histone deacetylase
HEK : human embryonic kidney

HIF-1 α : hypoxia-inducible factor 1 α
HK1 : hexokinase 1
HK-5320 : lignées de cellules souches corticales humaines différenciées
HMGCR : HMG-CoA reductase
HNF4 α : hepatocyte nuclear factor 4 α
HOPS : homotypic fusion and protein sorting
HSP : heat shock proteins
HT22 : lignée de neurones hippocampiques de souris
hTau : human Tau
Iba1 : allograft inflammatory factor 1
ICV : intra-cérébroventriculaire
IDE : insulín-degrading enzyme
IDH : isocitrate déshydrogénase
IFN γ : interféron γ
IKK : I κ B kinase
IL : interleukine
ILEI : interleukin-like epithelial-mesenchymal transition inducer
iNOS : inducible nitric oxide synthase
IP : intrapéritonéale
IP3R : inositol 1,4,5-trisphosphate receptor
iPSC : induced pluripotent stem cells
IR : insulino-résistance
IRAK4 : interleukin-1 receptor associated kinase-4
IRM : imagerie par résonance magnétique
I κ B : inhibitor of nuclear factor κ B
JAK/STAT : janus tyrosine kinase / signal transducers and activators of transcription
JMR : juxtamembrane region
JNK : c-Jun N-terminal kinase
KI : knock-in
KLC : kinesin-I light chain
KO : knock-out
KPI : kunitz protease inhibitor
LAMP : lysosomal-associated membrane protein
LAN5 : lignée de neuroblastomes humains
LC3 : microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LCR : liquide céphalorachidien
LIR : LC3-interacting region
LKB1 : liver kinase B1
LPS : lipopolysaccharide
LTD : dépression à long terme
LTP : potentialisation à long terme
M1/2 : microglie activée de type 1/2
MA : maladie d'Alzheimer
MAMs : mitochondria-associated membranes

MAP : Metformin in Alzheimer's Dementia Prevention
MAPT : microtubule associated protein tau
MC : milieu de culture
MCI : mild cognitive defects
MCL-1 : induced myeloid leukemia cell differentiation protein
MCU : mitochondrial calcium uniporter
MEF : mouse embryonic fibroblasts
MET : metformine
MFF : mitochondrial fission factor
MFN : mitofusine
MID1 : midline-1
MiD : mitochondrial dynamics proteins
Miro-1 : mitochondrial Rho GTPase 1
Mito-MET : metformine modifiée pour être adressée à la mitochondrie
MKK4 : MAPK Kinase 4
MME : membrane mitochondriale externe
MMI : membrane mitochondriale interne
MMSE : mini-mental state examination
MND : maladie neurodégénérative
Mn-SOD : manganese-dependant superoxyde dismutase
MO25 : mouse protein 25
MPP : mitochondrial processing peptidase
MPT : modification post-traductionnelle
mPTP : mitochondrial permeability transition pore
MT : microtubules
MT5-MMP : membrane-bound matrix metalloproteinase / η -sécrétase
mTORC1 : mTOR complex 1
MTS : mitochondrial targeting sequence
N2a : lignée neuronale murine
NADH : nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate
NBR1 : neighbor of BRCA1 gene 1 protein
NCLX : échangeur $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}/\text{Li}^+$
NCT : national clinical trial number
NDP52/CALCOCO2 : nuclear dot protein 52
NDUFB8 : NADH:Ubiquinone oxidoreductase subunit B8
NEP : néprilysine
NES : nuclear export sequence
NH₂Tau : NH₂-truncated Tau fragment
NHR : nuclear hormone receptor
NIA-AA : national institute of aging and alzheimer's association

NIX/BNIP3L : Nip3-like protein X
NF κ B : nuclear factor- κ B
NLS : nuclear localization sequence
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
NMDAR : récepteurs NMDA
NMN : nicotinamide mononucléotide
NO : acide nitrique
NPI : neuropsychiatric inventory
NR : nicotinamide riboside
OAG : oxydation des acides gras / β -oxydation
OGG1 : oxoguanine glycosylase 1
OPA1 : optic atrophy type 1
OPTN : optineurine
OSCP : oligomycin sensitivity conferring protein
OXPHOS : phosphorylation oxydative
p62/SQSTM1 : p62 / sequestosome 1
PARL : PINK1/PGAM5-associated rhomboid-like protease
PC12 : lignée de phéochromocytome de rat
PDH : pyruvate déshydrogénase
PE : phosphatidyléthanolamine
PEN-2 : presenilin enhancer 2
PET-scan : tomographie par émission de positons
PFK1 : phosphofructokinase 1
PFKFB3 : 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3
PGAM5 : PGAM family member 5, mitochondrial serine/threonine protein phosphatase
PGC1 α : peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1- α
pH : potentiel hydrogène
PHB2 : prohibitin-2
PHF : paires hélicoïdales de filaments
PI3P : phosphatidylinositol-3-phosphate
PINK1 : PTEN-induced kinase 1
PINK1₅₂ : fragment de PINK1 clivé de 52kDa
PLCG2 : phospholipase C-gamma 2
PLD1 : phospholipase D1
PLEKHM1 : pleckstrin homology and RUN domain containing M1
PP1/2 : protein phosphatase 1/2
PPAR : peroxisome proliferator-activated receptor
PPM1E : $\text{Mg}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -dependant protein phosphatase 1E
PRR : proline-rich region
PS1/2 : presenilin 1/2
PS19 : modèle de souris TauP301S

p-S65-Ub : chaîne de polyphospho-ubiquitine
PSL : nanoliposomes de phosphatidylsérine
pTau : Tau hyperphosphorylé
Rab : Ras-related protein
RAPTOR : regulatory-associated protein of mTOR
RE : réticulum endoplasmique
REB : réparation par excision de base
RGM : traitement resvératrol-glucose-malate
ROSmit : espèces réactives de l'oxygène mitochondriales
RSV : resvératrol
SAMP8 : modèle de sénescence accéléré murin
shRNA : short hairpin RNA
SIAH1 : Siah E3 Ubiquitin Protein Ligase 1
SIRT1 : sirtuine 1
SLA : sclérose latérale amyotrophique
SNARE : soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor
SNP : single nucleotide polymorphism
SO : stress oxydatif
SPECT : tomographie unique d'émission de photon
SREBP1 : sterol regulatory element-binding protein 1
STRAD25 : STE-20 related adaptor
STZ : streptozotocine
Syt7 : synaptotagmin-7
T21 : trisomie 21 / syndrome de Down
TAK1 : transforming growth factor β -activated kinase
TAX1BP1 : Tax1 binding protein 1
TBC1D : TBC1 domain family member 1
TBK1 : TANK binding kinase 1
Teff : lymphocytes T effecteurs
TFEB : transcription factor EB
THL : tréhalose
TIF-IA : transcription initiation factor IA
TIMM : translocase of inner mitochondrial membrane
TM : domaine transmembranaire

TMEM30A : transmembrane protein 30A
TNF- α : tumour necrosis factor α
TOMM : translocase of outer mitochondrial membrane
TRAIL : TNF-related apoptosis-inducing ligand
TRAK2 : trafficking kinesin protein 2
Treg : lymphocytes T régulateurs
TREM2 : triggering receptor expressed on myeloid cells 2
TRPV : transient receptor potential channel subfamily V
trx/trxR : thiorédoxine / thiorédoxine réductase
TSC2 : tuberous sclerosis complex 2
TSG : tétrahydroxy stilbène glycoside
t-Tau : Tau total
TXNIP : thioredoxin-interacting protein
UA : urolithine A
Ub : ubiquitine
Ubl : ubiquitin-like
UBR : Ubiquitin protein ligase E3 component N-recognin
ULK1 : Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1
UPR : unfolded protein response
VDAC : voltage-dependant anion channel
VE : vésicules extracellulaires
VIM : vimentine
VPS34 : vacuolar protein sorting 34
WIPI2 : WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 2
WT : wild type / type sauvage
ZMP : AICA ribotide (AICAR métabolisé)
 α/β -CTD : domaine C-terminal de la sous-unité α/β
 α -AID : α -auto-inhibitory domain
 α -KD : α -Kinase Domain
 α KGDH : α -cétoglutarate déshydrogénase
 β -CBM : β -carbohydrate-binding module
 $\Delta\Psi$ mit : potentiel de membrane mitochondrial

Introduction

La maladie d'Alzheimer

A) Généralités

La maladie d'Alzheimer (MA) est une maladie neurodégénérative (MND) liée à l'âge et causant une mort neuronale progressive et irréversible. Elle est la cause de démence la plus importante (60% à 80% des démences) à travers le monde, touchant plus de 35 millions de personnes. La prévalence mondiale de la MA est comprise entre 1% et 2% à 65 ans et double environ tous les 5 ans, au moins jusqu'à 90 ans (Qiu et al., 2009). La MA a des impacts sociétaux et économiques importants puisqu'elle n'a pas encore de traitement curatif et qu'elle impacte les malades de manière progressive sur des dizaines d'années. La MA a aussi un gros impact sur les aidants, ces proches non-professionnels de la santé qui s'occupent au quotidien des malades, mais aussi sur les sociétés, étant donné les moyens mobilisés pour la prise en charge des patients. Au vu de la tendance à l'augmentation globale de la durée de vie, certaines projections estiment que le nombre de malades Alzheimer pourrait doubler tous les 20 ans et ainsi atteindre 115 millions de malades en 2050 (Prince et al., 2013), ce qui préfigure une augmentation des coûts sociaux et économiques de cette maladie.

Une des difficultés avec la MA est que les modifications pathologiques débutent dans le cerveau des patients plus de 10 voire 20 ans avant l'apparition des symptômes cliniques, et passent donc inaperçues pour le patient bien que des changements des biomarqueurs puissent être détectables (*voir plus loin*).

La MA est parfois décrite comme un continuum de trois phases (*Figure 1*). La phase préclinique sans symptômes suivie d'une phase clinique caractérisée par des troubles cognitifs modérés (mild cognitive defects (MCI)) dus à la MA mais n'entraînant pas de démence et ne perturbant pas les activités du quotidien. Enfin, la dernière phase est la phase de démence due à la MA qui progresse d'une forme légère à modérée puis à sévère, reflétant l'aggravation des symptômes et la perte d'autonomie des patients jusqu'à leur décès.

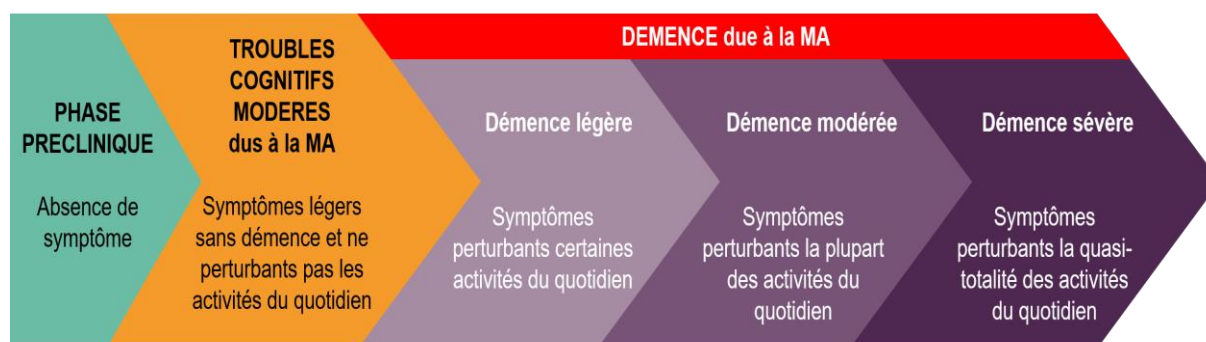


Figure 1 : Le continuum des phases de la MA. Adapté du ALZHEIMER'S ASSOCIATION REPORT 2021.

1) Données cliniques

a) *Symptômes comportementaux et tests neuropsychologiques*

Plusieurs années après le début des changements cérébraux, les symptômes de la MA commencent à apparaître tels que les problèmes de mémoires et de langage. Avec la progression de la maladie, d'autres symptômes apparaissent, comme des problèmes de communication, la confusion, des problèmes dans les tâches du quotidien (marcher, avaler), les patients deviennent alités et ont besoin d'une prise en charge permanente.

Le test le plus connu pour évaluer la démence est le **MMSE** (mini-mental state examination) qui permet de tester la mémoire de travail et la mémoire sémantique, l'attention, les praxies et l'orientation dans le temps et l'espace. D'autres tests existent, dont certains sont spécifiques pour les patients avec des symptômes légers à modérés, comme le **ADAS-Cog** (Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive) qui permet de tester l'attention, le langage, l'orientation, les fonctions exécutives et la mémoire, ou l'**ADCS-ADL** (Alzheimer's Disease Cooperative Study-Activities of Daily Living Scale) qui permet d'évaluer les capacités des patients Alzheimer à effectuer des tâches basiques et instrumentales du quotidien. Certains tests servent plutôt à différencier une personne saine d'une personne avec démence, comme le **CDR** (Clinical Dementia Rating Scale) ou le **NPI** (Neuropsychiatric Inventory), qui permet d'évaluer l'agitation, l'anxiété, l'apathie, les hallucinations, les problèmes d'humeurs, l'irritabilité, les problèmes moteurs et les problèmes de rythmes jour-nuit. De plus, le **CDR-SOB** (Clinical Dementia Rating-Sum of Boxes) est utilisé pour le diagnostic des démences légères, et le **CIBIC-Plus** (Clinician's Interview-Based Impression of Change Plus caregiver input) pour estimer le degré de la démence.

b) *Marqueurs histopathologiques*

La nature des deux marqueurs histologiques de la MA, communément connus sous le nom des **dégénérescences neurofibrillaires (DNF)** et des **plaques amyloïdes ou plaques séniles**, a été identifiée dans les années 1980 (*Figure 3*).

-Le premier marqueur histopathologique de la MA est présent dans les neurones, et est la conséquence de l'hyperphosphorylation anormale de protéines Tau (pTau) qui vont alors perdre leur affinité pour les microtubules et s'accumuler en DNF dans le compartiment somato-dendritique (*figure 3*) (Ittner et al., 2010). La protéine Tau possède un domaine de projection N-terminal déstructuré et très flexible, suivi d'un domaine riche en proline (PRR) qui permet notamment à Tau de se lier à des protéines (*Figure 2*) (Lau et al., 2016). Enfin, la protéine Tau possède un domaine de liaison aux microtubules (MT) du cytosquelette pour les stabiliser (Barbier et al., 2019) La protéine Tau est codée par le gène *MAPT* (microtubule associated protein tau) dont l'épissage alternatif code pour six isoformes différentes : trois isoformes, dites variantes 3R possédant trois motifs répétés dans leur domaine de liaison aux MT, et les trois autres isoformes, dites variantes 4R possédant quatre motifs répétés liant plus fortement les MT. La liaison de Tau sur les MT est régulée par sa phosphorylation, qui diminue son affinité. Ainsi, en cas d'hyperphosphorylation, Tau perd complètement son affinité pour les MT et va s'agréger en oligomères, puis en paires hélicoïdales de filaments (PHF) et enfin en DNF. La MA est classifiée en MND « tauopathique » accumulant les formes 3R et 4R de Tau. Néanmoins, il est important de noter que l'accumulation de Tau dans les neurones est commune à plus de vingt MND « tauopathiques » et est même la seule cause de certaines d'entre elles, alors qualifiées de tauopathies primaires.

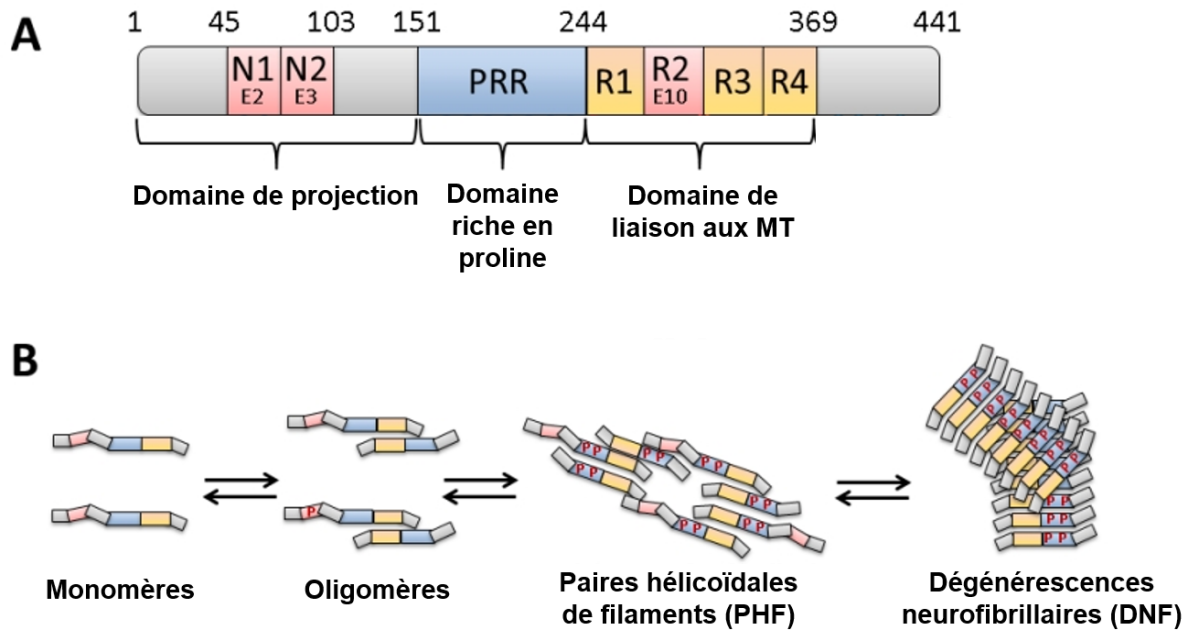


Figure 2 : Structure des domaines de la protéine Tau et formation des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) associées à l'accumulation des protéines Tau hyperphosphorylées. Adapté de (Heinisch and Brandt, 2016). A) Structure des domaines de l'isoforme la plus longue de Tau, présente dans les neurones. Cette isoforme possède les domaines N-terminaux N1 et N2, codés par les exons E2 et E3 respectivement, et quatre répétitions de domaines de liaisons aux microtubules (MT) R1, R2 (codé par l'exon E10), R3 et R4. PRR : Proline-Rich Region. B) Présentation schématique des différentes conformations de Tau, en fonctions de la quantité de résidus phosphorylés (P).

-Le deuxième marqueur histopathologique de la MA est présent dans l'espace extracellulaire, et est la conséquence de l'agrégation de peptides A β en plaques amyloïdes / séniles (*Figure 3*). L'origine et la formation des plaques séniles seront décrites plus loin.

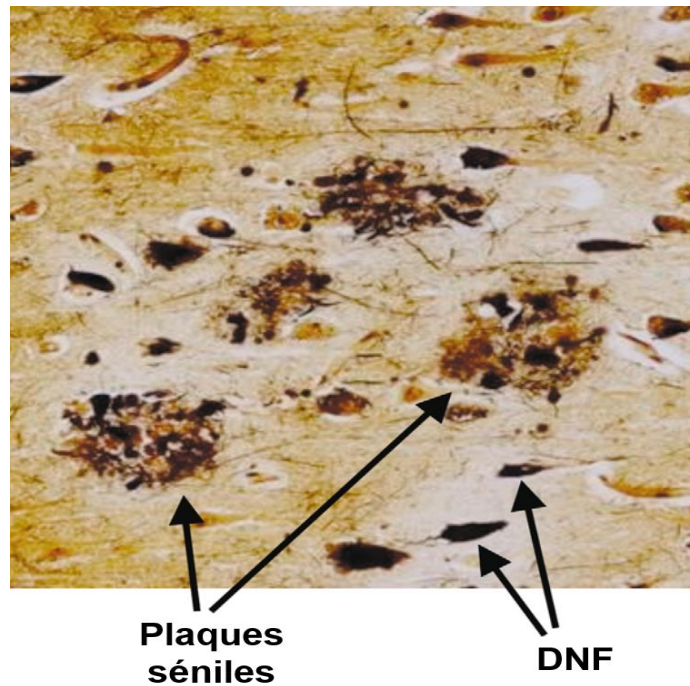


Figure 3 : Les deux marqueurs histopathologiques de la MA : Les plaques séniles extracellulaires et les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) intraneuronaux. Adapté de (Blennow et al., 2006)

Ces changements histopathologiques s'accompagnent d'une **atrophie cérébrale** due à la mort neuronale dans certaines zones comme l'hippocampe et le cortex, ainsi que d'un élargissement des ventricules (Figure 4).

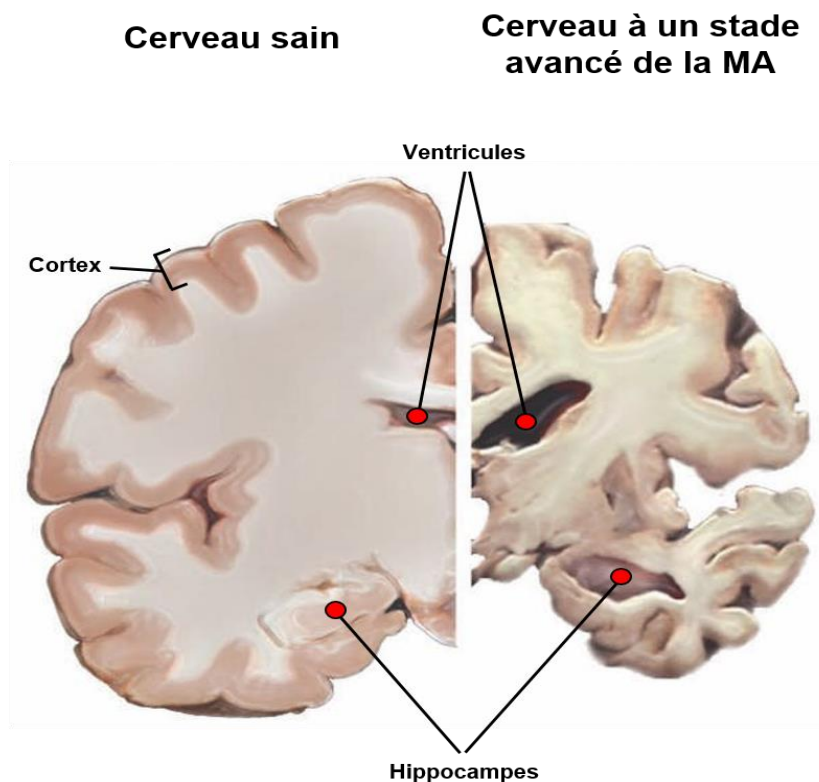


Figure 4 : Altérations anatomiques cérébrales dans la MA. (source : <https://www.nia.nih.gov/health/alzheimers-disease-fact-sheet>).

Néanmoins, un fait important est que les dépôts de plaques amyloïdes comme la formation de DNF progressent de région cérébrale en région cérébrale de manière stéréotypée (*Figure 5*). Les dépôts amyloïdes apparaissent avant la pathologie Tau (si cette dernière apparaît), et progressent selon une échelle de trois stades, avec au stade A, des plaques à la base des lobes frontaux, temporaux et occipitaux, au stade B, des plaques en plus dans quasiment toutes les zones corticales, qui seront entièrement atteintes durant le stade C (Braak and Braak, 1991). La progression de la pathologie Tau peut être exprimée selon une échelle connue sous le nom des stades de Braak. Selon cette échelle, les stades I et II correspondent aux DNF présents dans les cortex transentorhinal et entorhinal, les stades III et IV aux DNF présents en plus dans les régions limbiques, dont l'hippocampe, et finalement les stades V et VI de Braak correspondent aux DNF également présents au niveau du néocortex et des couches externes des hémisphères cérébraux (Braak et al., 2006).

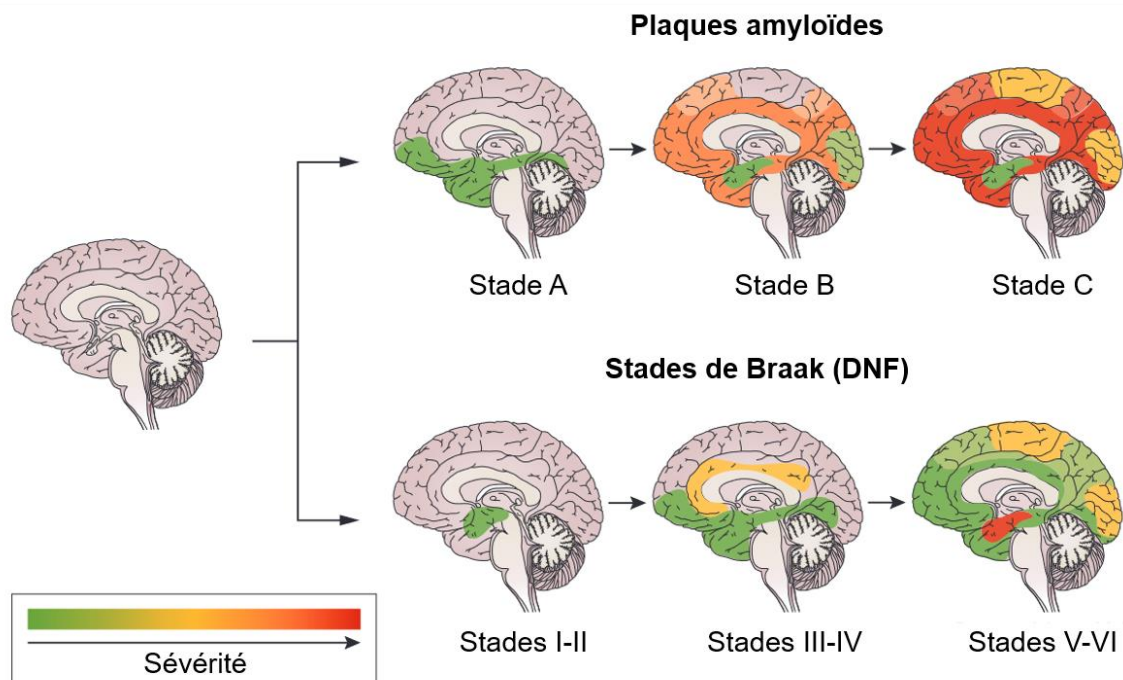


Figure 5 : Propagation des plaques amyloïdes et des dégénérescences neurofibrillaires (DNF) dans la MA. Adapté de (Masters et al., 2015).

c) Le diagnostic à l'ère des biomarqueurs

En phase préclinique, les patients ne présentent ni démence ni symptômes cliniques mais ils ont des changements mesurables de certains biomarqueurs de la MA. Plusieurs méthodes d'imageries sont utilisées pour analyser différents biomarqueurs de la maladie. La tomographie par émission de positons (**PET-scan**) permet de mesurer l'accumulation de l'A β en plaques séniles avec un traceur spécifique de l'A β (Vizamy ([¹⁸F]flutemetamol), Amyvid ([¹⁸F]florbetapir) ou Neuraceq ([¹⁸F]florbetaben)), de mesurer la formation de DNF avec un traceur de Tau (Tauvid ([¹⁸F]flortaucipir), et de mesurer la diminution de la consommation du glucose par le cerveau avec du fluorodésoxyglucose radioactif ([¹⁸F]FDG). Cependant, le signal au PET-scan [¹⁸F]FDG résulte de la consommation de glucose par les neurones, mais aussi par les astrocytes et par les microglies activées (Xiang et al., 2021). Ainsi, une activation microgiale précoce peut « masquer » le début de la baisse de consommation du glucose par les neurones. La tomodensitométrie unique d'émission de photon (**SPECT**) permet de détecter des

hypoperfusions dans les zones affectées par la MA, ce qui représente un marqueur de dégât neuronal. Enfin, l'imagerie par résonance magnétique (**IRM**) anatomique permet de mesurer le volume cérébral et donc l'atrophie de certaines régions du cerveau. Il est à noter que le cerveau s'atrophie avec l'âge mais cette atrophie est plus importante et plus rapide dans la MA. L'analyse du liquide céphalorachidien (**LCR**) après ponction lombaire, permet d'évaluer la baisse de la concentration de l' $A\beta_{1-42}$ et du ratio $A\beta_{1-42/40}$ due à l'agrégation de l' $A\beta_{1-42}$ dans le cerveau. L'analyse du LCR permet aussi d'évaluer l'augmentation de Tau total (t-Tau) qui est considéré comme un marqueur de l'intensité de la neurodégénération car ce t-Tau dans le LCR proviendrait de neurones mourants qui sécrèteraient leurs protéines du cytosquelette. De plus, dans le LCR, les médecins peuvent également évaluer l'augmentation de pTau (pThr108 ou 217), un marqueur spécifique des DNF de la MA (Niemantsverdriet et al., 2017). Il est important de noter que des changements des biomarqueurs de la MA n'impliquent pas fatalement que le patient va développer des symptômes de la MA avant son décès.

Grâce au développement des techniques de détection des biomarqueurs, les NIA-AA (national institute of aging and alzheimer's association) ont proposé en 2018, une vision neurobiologique, et non plus syndromique, pour le diagnostic, selon laquelle la MA est diagnostiquée sur la base de la présence simultanée de niveaux anormaux de biomarqueurs amyloïde et Tau, indépendamment des symptômes cliniques (Jack et al., 2018). Les NIA-AA proposent également une classification des patients, dite **A/T/N**, selon le statut de leur biomarqueurs amyloïde (A), Tau (T) et de neurodégénération (N) (*Figure 6*). Cette méthode permet d'écarter du diagnostic les symptômes cliniques qui peuvent être dus à d'autres maladies et permet également de détecter les patients en phase préclinique de la MA. Identifier les patients en phase préclinique est important, notamment pour le développement de futurs biomarqueurs sanguins mais l'est aussi pour la mise en place des essais cliniques pouvant apporter des résultats plus bénéfiques que les essais sur des patients symptomatiques. Les techniques actuelles de détection des biomarqueurs étant onéreuses et parfois invasives, l'arrivée de nouvelles techniques standardisées de détection de biomarqueurs dans le sang des patients est très attendue par les cliniciens et les patients. D'ailleurs, un test sanguin, **PrecivityAD™**, d'un coût de 1 250\$ a été approuvé pour les Etats-Unis et pour l'Union Européenne en 2020. Il s'agit d'une technique d'analyse des niveaux de l' $A\beta_{1-40}$, de l' $A\beta_{1-42}$ et du protéotype d'APOE (apolipoprotéine E) dans le plasma humain par spectrométrie de masse et chromatographie liquide. Il est bien sûr attendu que d'autres techniques de détection de biomarqueurs sanguins voient le jour, notamment concernant la pathologie Tau (Kirmess et al., 2021).

Biomarqueur	Catégorie	Détection
A : amyloïde (plaques et état pathologique)	Biochimie (LCR/plasma)	Niveaux d'Aβ ₁₋₄₂ ou du ratio d'Aβ _{1-42/40}
	Imagerie	PET-scan Aβ
T : Tau (DNF et état pathologique)	Biochimie (LCR)	Niveaux de pT108/217 Tau
	Imagerie	PET-scan Tau
(N) : Neurodégénération et dégât neuronal	Biochimie (LCR)	Niveaux de t-Tau
	Imagerie	PET-scan avec [¹⁸ F]FDG SPECT IRM anatomique

Figure 6 : Classification A/N/T : signification des termes et techniques d'évaluation des biomarqueurs.
Adapté de Jack Jr. *et al.* 2018 (2018 National Institute on Aging-Alzheimer's Association (NIA-AA) Research Framework).

Un point important concernant ces biomarqueurs sont leurs différentes cinétiques d'augmentation et de détection (*Figure 7*). L'augmentation de l'Aβ débute et est détectable dans le LCR et par PET-scan tôt dans la MA et atteint un plateau au moment de l'apparition des premiers symptômes. S'en suit l'accumulation de Tau lié aux DNF, ainsi que les dysfonctions anatomiques et fonctionnelles durant la phase préclinique.

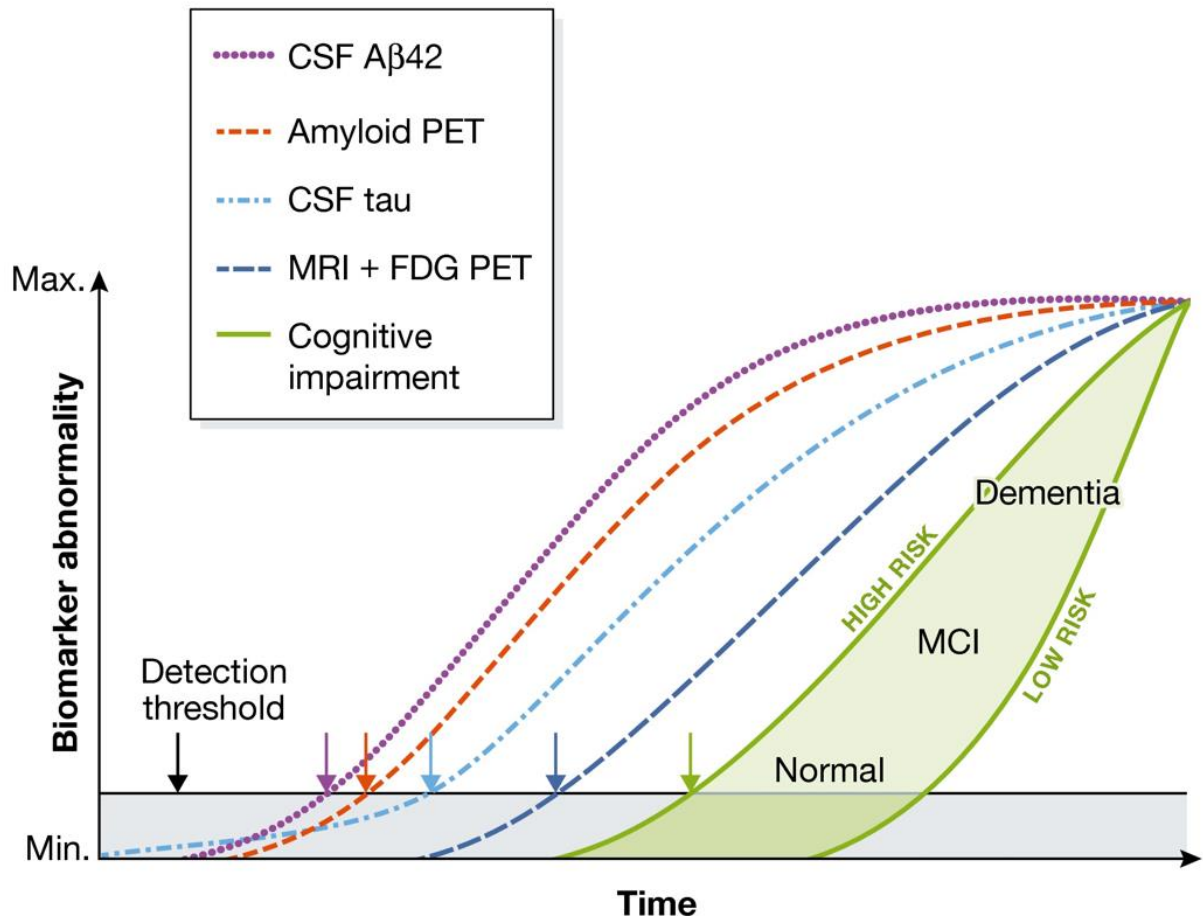


Figure 7 : Evolution temporelle des niveaux de biomarqueurs et des symptômes cliniques. (Selkoe and Hardy, 2016).

L'existence de plusieurs sous-types de la MA (au-delà des distinctions entre formes autosomiques dominantes et sporadiques) a récemment été appuyée par plusieurs résultats. Une méta-analyse des observations dans des cerveaux post-mortem et des données de neuro-imagerie a conclu à une sous-division en quatre sous-types « biologiques » de la MA en se basant sur la propagation de la pathologie Tau et de l'atrophie cérébrale (*Figure 8A*) (Ferreira et al., 2020). Ainsi il y aurait une MA « typique », « avec atrophie minimale », « principalement limbique » et une MA « épargnant l'hippocampe ». Une étude utilisant des algorithmes de « machine learning » sur des jeux de données d'imagerie issus exclusivement de PET-scan pour Tau (traceur [¹⁸F]flortaucipir) de 1667 patients a identifié quatre profils de la progression de la pathologie Tau de région en région (*Figure 8B*) (Vogel et al., 2021). Les quatre profils sont : « S1 : principalement limbique » avec une progression spatiale similaire à celle décrite par Braak (Braak et al., 2006), « S2 : épargnant le lobe temporal médian », « S3 : principalement lobe temporal postérieur » et « S4 : principalement lobe temporal latéral ». Ces profils montrent également une corrélation avec la cinétique de dégradation du score MMSE (Vogel et al., 2021). Une autre étude d'analyse bioinformatique de transcriptomes de patients Alzheimer a identifié cinq sous-types « moléculaires » de MA, en fonction des voies moléculaires différemment dérégulées (neurodégénération due à Tau, neuroinflammation due à l'Aβ, signalisation synaptique, activation immunitaire, mitochondries et myélinisation) (Neff et al., 2021). Enfin, l'analyse protéomique de LCR de patients Alzheimer a identifié trois sous-types pathophysiologiques de patients, impliquant l'hyperplasticité neuronale, l'activation du système immunitaire inné et la dysfonction de la barrière hématoencéphalique (BHE) (Tijms et al., 2020).

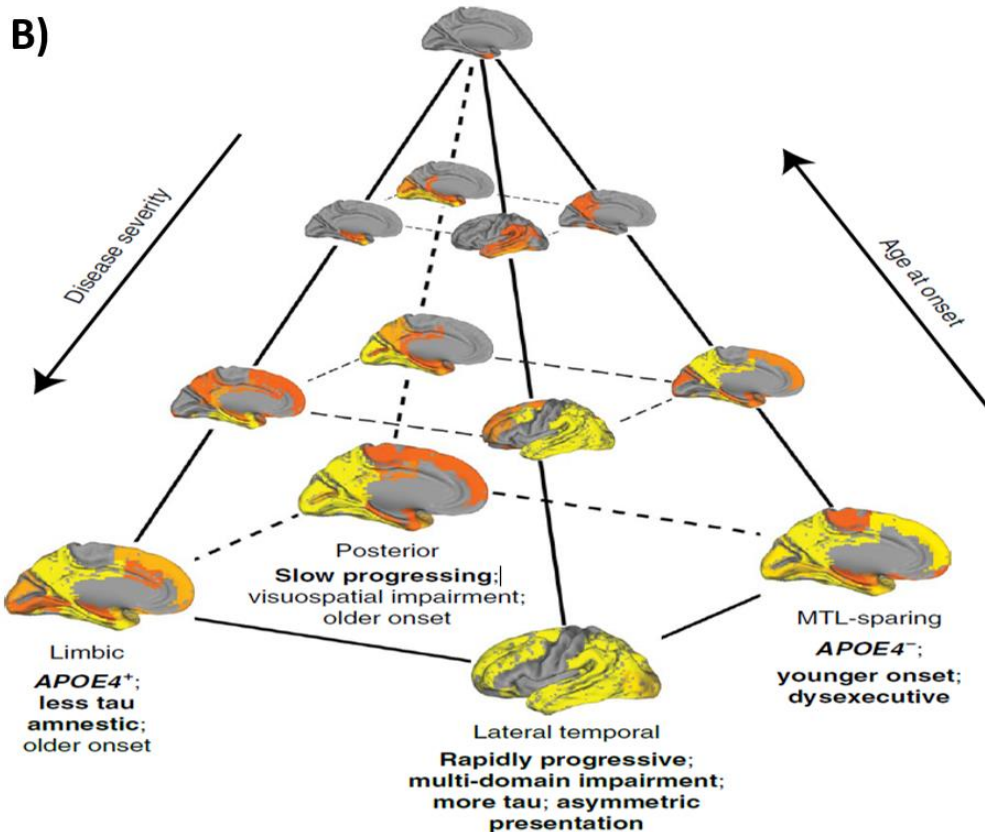
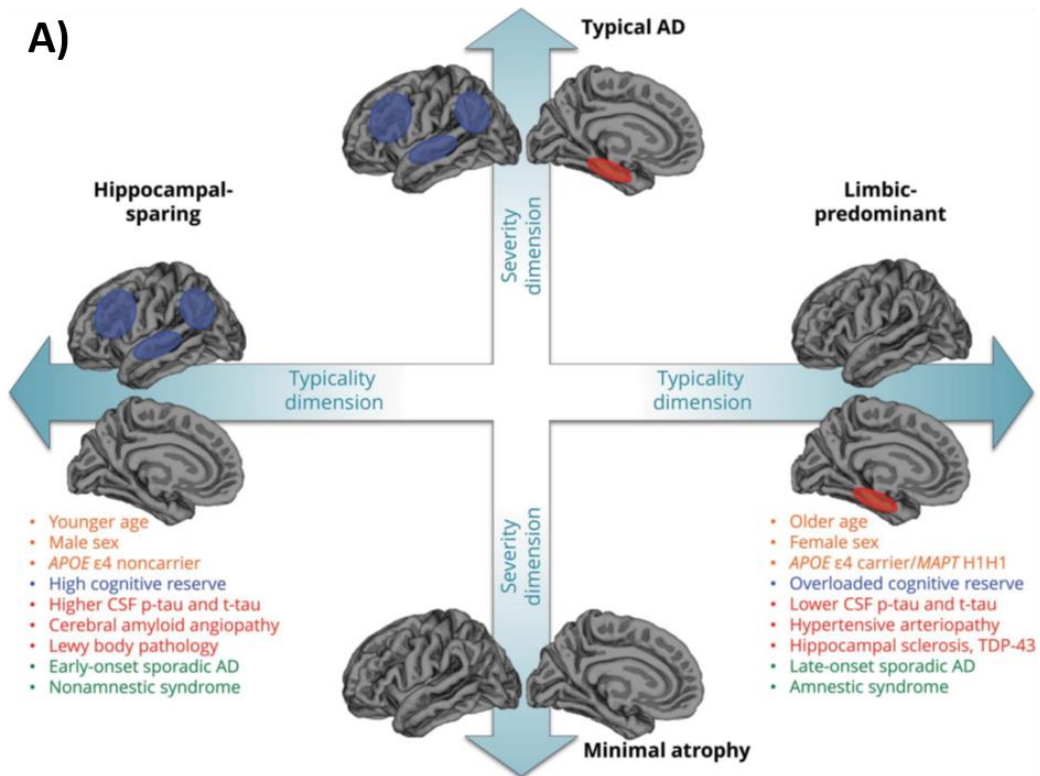


Figure 8 : Deux propositions de classifications des sous-types de la MA. A) Quatre sous-types « biologiques » de la MA selon l'analyse de la propagation de la pathologie Tau et de l'atrophie cérébrale (Ferreira et al., 2020). B) Quatre profils de patients par rapport à leur propagation de la pathologie Tau (Vogel et al., 2021).

2) Données thérapeutiques

a) Thérapies disponibles

Il existe actuellement en France plusieurs médicaments pouvant être prescrits contre les symptômes de la MA. La liste compte trois inhibiteurs de la cholinestérase (**Donépézil** (Aricept), **Rivastigmine** (Exelon) et **Galantamine** (Reminyl)) qui améliorent temporairement les symptômes en augmentant les niveaux du neurotransmetteur acétylcholine (diminués dans la MA) et donc la neurotransmission cholinergique. S'ajoute à cette liste un inhibiteur non-compétitif des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique), la **Mémantine** (Ebixa), qui protège de la stimulation excessive et toxique de ces récepteurs qui a lieu dans la MA. Cependant, en 2016, la HAS (haute autorité de santé) a estimé que la balance bénéfices / risques n'était pas suffisamment positive et, par conséquent, « la HAS a considéré que ces médicaments n'avaient plus de place dans la stratégie thérapeutique du traitement symptomatique de la maladie d'Alzheimer », entraînant la fin de leur remboursement par la Sécurité Sociale en août 2018. Ces médicaments sont dits symptomatiques car prescrits dans le but de réduire les symptômes de la MA, mais sont non-curatifs, car ils ne ralentissent ni ne stoppent la progression de la MA. La HAS promeut plutôt des approches non médicamenteuses de prise en charge et d'accompagnement des patients et des aidants, pour améliorer leur autonomie et leur qualité de vie. Cette amélioration passe notamment par une prise en charge orthophonique, psychologique et psychiatrique et une stimulation cognitive et de l'activité physique.

b) Traitements en cours d'essai clinique

Au cours des dernières décennies de recherches, plusieurs causes de la MA ont été proposées, débouchant parfois sur le développement de nouvelles molécules testées lors d'essais cliniques. Malheureusement, les essais cliniques n'ont pas été concluants dans la majorité des cas. Actuellement néanmoins, il existe une molécule qui est allée plus loin que toutes les autres molécules testées contre la MA : l'**Aduhelm (Aducanumab)**. Il s'agit d'un anticorps humain monoclonal dirigé contre l'A β agrégé mais pas contre les monomères de l'A β (Figure 9).

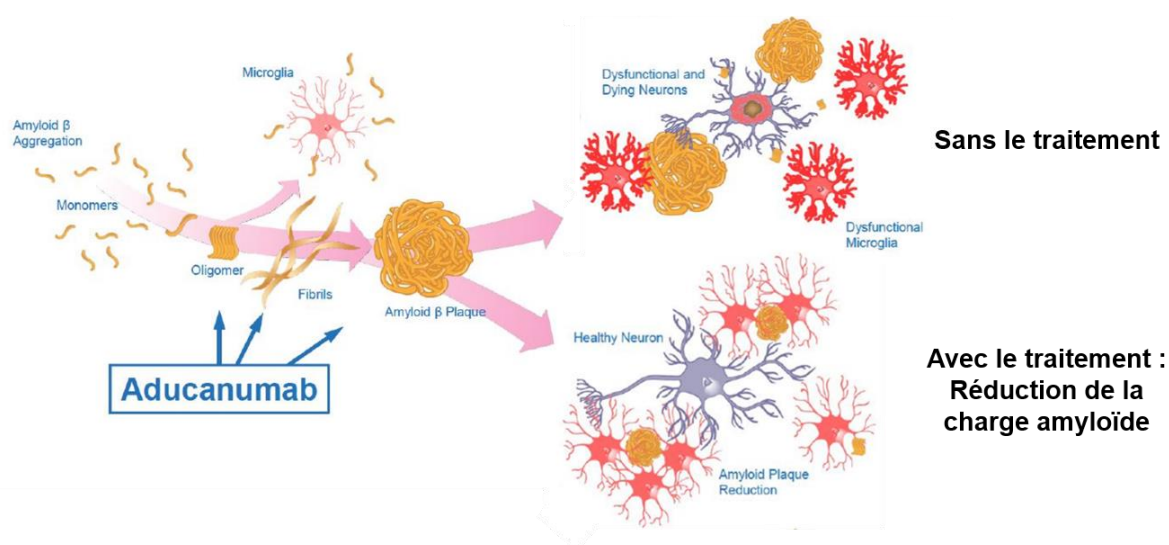


Figure 9 : Mécanisme d'action de l'anticorps Aducanumab. (Esang and Gupta, 2021).

Il faut noter que plusieurs étapes dans le développement de l'Aduhelm ne sont pas exemptes de critiques. Biogen, la compagnie pharmaceutique développant cet anticorps avait déposé une demande d'autorisation de mise sur le marché à la FDA (USA food and drug administration) en juillet 2020 suite à deux essais de phase 3 EMERGE et ENGAGE, aux designs identiques, avec pour buts annoncés d'évaluer la sûreté et l'efficacité de l'Aduhelm chez des patients MCI ou avec une MA légère. Cependant, ces deux essais ont été stoppés en mars 2019, car il a été estimé qu'ils n'atteindraient pas leurs objectifs primaires même s'ils étaient menés jusqu'à leur terme. L'histoire du développement de l'Aduhelm aurait pu s'arrêter là si ce n'est que Biogen a réanalysé les données d'EMERGE et d'ENGAGE. En décembre 2019, ils ont communiqué, sur la base de leurs nouvelles analyses post-hoc, que l'Aduhelm, de manière dose-dépendante, permettait de réduire significativement la quantité de l'A β cérébrale (évalué par PET-scan) dans les deux essais, mais permettait d'atteindre son objectif clinique primaire (amélioration au test du CDR-SOB) et secondaires (MMSE, ADAS-Cog et ADCS-ADL-MCI) uniquement dans l'essai EMERGE. Cependant, sur la base des données rendues publiques en décembre 2019 par Biogen, des chercheurs ont au contraire publié que ces données ne permettaient pas de conclure à un bénéfice clinique de l'Aduhelm (Knopman et al., 2021). Et d'ailleurs, en réponse à la demande de Biogen, la FDA a conclu en juin 2021 qu'il restait des incertitudes concernant l'efficacité clinique de l'Aduhelm, mais que l'Aduhelm était bel et bien capable de réduire la charge amyloïde mesuré par PET-scan, ce qui promettait raisonnablement une amélioration du tableau clinique des patients. Cependant, la réduction du nombre de plaques n'implique pas automatiquement une amélioration des capacités cognitives, comme l'ont conclu les tests d'autres molécules thérapeutiques ainsi que l'essai ENGAGE, et nécessite dans tous les cas d'être incontestablement démontré. Néanmoins, plutôt que d'exiger un nouvel essai de phase 3 mené jusqu'à son terme, la FDA a décerné à l'Aduhelm une autorisation de mise sur le marché par une voie accélérée, conditionnée à la réalisation d'une nouvelle étude de l'efficacité clinique de ce traitement. L'Aduhelm a été autorisé par la FDA non pas pour améliorer les symptômes cognitifs mais pour réduire un des marqueurs de la maladie, les plaques A β , chez des patients à des stades peu avancés. En juillet 2021, Biogen a annoncé la mise en place d'un essai clinique de phase 4 appelé ICARE AD-US, qui prévoit de suivre plus de 6 000 sujets sur 5 ans. Cependant, comme cet essai clinique ne prévoit aucun groupe contrôle ou placebo (les 6 000 sujets seront traités avec l'Aduhelm), l'efficacité du traitement ne sera pas évaluée (on ne pourra pas évaluer quelle aurait été l'évolution de la MA chez les sujet non traités), seuls les effets du traitement chez les sujets traités pourront être mesurés. Une évaluation de l'efficacité de l'Aduhelm étant requise par la FDA, Biogen a promis qu'une telle évaluation serait mise en place. Enfin, même s'il était efficace et autorisé partout dans le monde, ce traitement par injection intraveineuse a un coût élevé d'environ 43 000€ par personne / an (Walsh et al., 2021).

Les essais cliniques utilisant l'Aduhelm présentent la limite d'être réalisées sur des patients symptomatiques présentant probablement des dégâts cérébraux trop importants pour être atténués après des années de phase préclinique. L'objectif de l'essai clinique de phase 3 TRAILBLAZER-ALZ3 (NCT05026866), débuté en août 2021, est de tester l'efficacité du **Donanemab** à prévenir l'apparition des symptômes cliniques chez des patients au stade préclinique (avec des concentrations plasmatiques élevés de pThr217-Tau). Le Donanemab est un anticorps dirigé contre une espèce particulière du peptide A β , dont les deux premiers résidus N-terminaux ont été retiré et dont le glutamate en position 3 est cyclisé en pyroglutamate, ce qui rend le peptide plus prompt à s'agréger (Sofola-Adesakin et al., 2016).

Cependant, les études menées après la formulation de « l'hypothèse de la cascade amyloïde » en 1992 concluent que c'est plutôt la propagation de la pathologie Tau dans le cerveau, et non la propagation des plaques amyloïdes, qui corrèle le mieux avec la progression des défauts cognitifs de la MA (Bejanin et al., 2017). Ainsi, certains traitements candidats ciblant l'inhibition de kinases impliquées dans la phosphorylation de Tau ou sa stabilisation sur les microtubules ont aussi été testés chez l'humain, mais furent soit inefficaces, soit toxiques (Sayas, 2020). Il faut noter que certaines molécules comme le **Nilotinib** et le **LMTX** visant à réduire l'accumulation de Tau, ainsi que différents anticorps dirigés contre diverses espèces de Tau (monomérique, fibrillaire, agrégé ou tronqué) sont en cours d'essais cliniques (Sayas, 2020). Ainsi, Genentech et AC Immune, ont communiqué le 31 août 2021, avoir la première preuve qu'un anticorps monoclonal contre Tau (**Semorinemab**), se liant sur la partie N-

terminale des six isoformes de Tau soluble, qu'il soit monomérique ou oligomérique et quel que soit son état de phosphorylation, a une efficacité clinique chez des patients symptomatiques de la MA (<https://ir.acimmune.com/static-files/602bde95-9879-4dbb-849d-8d6777b349aa>). Lors d'un essai clinique de phase 2 (LAURIET) sur des patients à des stades légers à modérés, le Semorinemab a, effectivement, permis de réduire le déclin du score à l'ADAS-Cog11, mais pas celui de l'ADCS-ADL, ni ceux du CDR-SOB et du MMSE.

B) Les différentes formes de la MA

1) Mutations autosomiques dominantes et formes familiales

Les formes familiales de la MA représentent seulement 1% à 2% des cas de la MA, mais les symptômes de ces formes familiales apparaissent avant 65 ans et parfois dès la trentaine, et progressent plus rapidement que dans les formes sporadiques de la MA. Les formes familiales sont liées à des mutations autosomiques dominantes dans un des trois gènes suivants : **APP** (amyloid precursor protein), **PS1** (presenilin 1) ou **PS2** (presenilin 2). Néanmoins, il existe des cas de MA catégorisés comme sporadiques débutant précocement chez des patients portant des mutations dans les gènes **APP**, **PS1** ou **PS2** qu'ils n'ont pas héritées de leurs parents mais qui sont dues à des mutations *de novo* (Lacour et al., 2019). L'existence de ces cas souligne le fait que parler de formes autosomiques dominantes est plus pertinent que de parler de formes « familiales ».

a) Mutations du gène de l'APP

La première identification de mutations autosomiques dominantes dans le gène **APP** (chromosome 21) date de 1991 avec la mutation dite « **Londonienne** » (V717I) observée dans une famille londonienne développant une MA en moyenne à partir de 57 ans ainsi que dans une famille aux Etats-Unis (Goate et al., 1991). Cette mutation cause une augmentation de l'A β ₁₋₄₂. Actuellement, 70 mutations du gène de l'APP sont répertoriées sur le site Alzforum (<https://www.alzforum.org/mutations/app>). Un an après l'identification de la mutation londonienne, a été identifié la double mutation **suédoise** (APP^{swe} : K670N et M671L) au niveau du site de clivage de la β -sécrétase qui provoque une augmentation du clivage de l'APP par la voie amyloïde (avec majoritairement un clivage par la β -sécrétase sur le site β et non β'). Des modèles cellulaires ou de souris (comme les Tg2576 ou 3xTgAD) surexprimant l'APP humain avec les mutations suédoises, permettent ainsi d'augmenter la production de l'A β , et de mimer la pathologie amyloïde avec des dépôts de plaques séniles dans le cerveau des souris. Toutes les mutations de l'APP ne sont pas autosomiques dominantes causant la MA, comme les mutations **islandaise** et **italienne** par exemple. La mutation islandaise (A673T) de l'APP a été décrite comme étant protectrice, montrant une réduction de 40% de la production de l'A β ₁₋₄₀ et de l'A β ₁₋₄₂ *in vitro* (Jonsson et al., 2012). Ce résidu muté est le deuxième de la séquence de l'A β et fait partie de la séquence de reconnaissance par la β -sécrétase, faisant de l'APP (A673T) un « moins bon » substrat pour la β -sécrétase. De plus, les peptides A β produits sont moins prônes à s'agréger (Maloney et al., 2014). La mutation italienne de l'APP (APP^{Ita}) cause la MA de façon récessive. Elle concerne le même résidu que la mutation protectrice islandaise, mais la substitution est différente (A673V) et favorise le clivage par la β -sécrétase sur le site β plutôt que β' , augmentant la production du fragment C99, du ratio C99/C89 et de l'A β (*décrits plus loin*) (Zhang et al., 2017b). Il a aussi été rapporté que des duplications du gène **APP** provoquaient des formes de MA autosomiques dominantes débutant précocement (Rovelet-Lecrux et al., 2006). La MA est également une conséquence de la trisomie 21 (T21), causée par la présence de trois chromosomes 21, donc de trois copies d'APP et donc d'une production excessive et une accumulation de l'A β (Maciejewska et al., 2021).

b) Mutations des gènes des présénilines

Actuellement, il y a plus de 340 mutations du gène *PS1* (chromosome 14) associées à la MA (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-1>) faisant des mutations de *PS1* les principales causes des formes familiales de la MA (70% à 80% des cas). Il existe plus de 80 mutations du gène *PS2* (chromosome 1) associées à la MA (<https://www.alzforum.org/mutations/psen-2>). *PS1* et *PS2* sont deux sous-unités composant le cœur catalytique du complexe γ -sécrétase participant au métabolisme de l'APP (*décrits plus loin*). La plupart des mutations de *PS1* se situent dans les domaines transmembranaires des présénilines et provoquent une augmentation du ratio $A\beta_{1-42/40}$, soit par une réduction de la production de l' $A\beta_{1-40}$ soit en augmentant celle de l' $A\beta_{1-42}$ (Group, 1995). Ainsi, la mutation *PS1* (M146V) provoque une augmentation de la production de l' $A\beta_{1-42}$, notamment en réduisant son clivage en $A\beta_{1-38}$ (Group, 1995) et une augmentation de la production de C99 (Kwart et al., 2019). Les mutations dans *PS2* causent également une forte augmentation du ratio $A\beta_{1-42/40}$ extracellulaire, à la fois par une augmentation des niveaux de l' $A\beta_{1-42}$ et par une réduction de ceux $A\beta_{1-40}$ (Group, 1995). En conclusion, on connaît aujourd'hui presque 500 mutations autosomiques dominantes, quasiment toujours héritées, qui vont affecter le métabolisme de l'APP, altérant la production des différentes espèces de l' $A\beta$ et donc leurs propensions à s'agréger et qui résultent (sauf pour la mutation islandaise) en une augmentation de la formation de plaques amyloïdes. Comme toutes les mutations autosomiques dominantes associées à la MA impactent la production du peptide amyloïde alors qu'aucune mutation affectant l'hyperphosphorylation de Tau n'est associée à la MA, Hardy et Higgins ont formulés en 1992 « **l'hypothèse de la cascade amyloïde** » (Hardy and Higgins, 1992).

2) Formes sporadiques et facteurs de risques

La grande majorité des cas de la MA (plus de 98%) sont classifiés comme forme sporadique. Les symptômes des formes sporadiques apparaissent en général plus tardivement et évoluent plus lentement que pour les formes autosomiques dominantes, bien que ce ne soit pas toujours le cas. C'est avec ces formes sporadiques que l'on se confronte à toute la complexité et à l'aspect multifactoriel de la MA. En effet, il est admis que les formes sporadiques sont le résultat de complexes interactions entre le génome d'un individu, son style de vie et des facteurs environnementaux. Parmi chacun de ces trois paramètres, il a été identifié des facteurs de risques, c'est-à-dire un facteur qui à lui seul n'est ni nécessaire ni suffisant pour provoquer la MA, mais qui peut la modifier (le plus souvent en favorisant son développement).

a) Facteurs de risques génétiques

Le premier, et durant des années le seul, facteur de risque génétique associé à la forme sporadique de la MA fût le gène *APOE4*. Il existe trois allèles de ce gène (*APOE2*, *APOE3* et *APOE4*). Le génotype le plus commun est *APOE3/APOE3* et la présence d'un allèle *APOE4* augmente le risque de développer la MA d'un facteur quatre et d'un facteur douze pour deux allèles *APOE4*, faisant de l'*APOE4* le plus important facteur de risque génétique (Mahley and Huang, 2012). En effet, il est estimé qu'entre 40% et 65% des patients avec une démence due à la MA possèdent au moins un allèle *APOE4* (<https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2021.pdf>). A l'inverse, l'allèle *APOE2* réduit ce risque comparé à l'*APOE4* et à l'*APOE3* (Mahley and Huang, 2012). L'*APOE* est le principal transporteur du cholestérol dans le cerveau, majoritairement exprimé par les astrocytes et les microglies activées (Flowers and Rebeck, 2020). L'*APOE* est impliqué dans le développement cérébral et la plasticité synaptique (Lane-Donovan and Herz, 2017), mais aussi dans la réduction de la réponse

neuroinflammatoire (Pocivavsek et al., 2009) et la clairance du peptide amyloïde (Rasmussen et al., 2018). D'ailleurs la capacité de chacune des isoformes d'APOE de lier l'Aβ et de promouvoir sa clairance a été évaluée comme suit : APOEε2 > APOEε3 > APOEε4 (Castellano et al., 2011). Il est à signaler que chez une patiente porteuse de la mutation autosomique dominante *PS1* (E280A), la présence de deux allèles APOEε3 avec la mutation rare « **Christchurch** » (R136S) semble avoir été protectrice (Arboleda-Velasquez et al., 2019). Malgré une charge en plaques séniles très élevée, cette patiente présentait peu de DNF, d'hypométabolisme et d'atrophie cérébrale, ce qui explique son entrée dans la phase MCI seulement après ses soixante-dix ans, soit 30 ans plus tard que la plupart des porteurs de *PS1* (E280A). Une autre mutation de l'allèle APOEε3, dite « **Jacksonville** » (V236E) est également protectrice car elle réduit la propension d'APOE à s'agréger et augmente ses capacités à se lier et transporter les lipides (Liu et al., 2021).

Les études d'associations pan-génomiques (**genome-wide association study (GWAS)**) qui comparent les fréquences de SNPs (single nucleotide polymorphisms) ou de variants entre une population contrôle et une population avec la MA, ont permis de recenser plus de 40 variants génétiques associés à la MA (*Tableau 1*) (Bellenguez et al., 2020a). Les grandes fonctions communément associées à plusieurs de ces gènes sont l'inflammation (dont l'activation des microglies), le métabolisme des lipides, le métabolisme de l'APP, l'endocytose, les fonctions synaptiques, la régulation épigénétique le transport axonal, le cytosquelette et Tau (Bellenguez et al., 2020b; Carmona et al., 2018; Kunkle et al., 2019). La détection de ces facteurs de risques génétiques est en faveur de l'implication de protéines partenaires de Tau et de protéines affectant le métabolisme de l'APP dans les formes sporadiques de la MA. En effet, l'*ADAM17* (*A disintegrin and metalloprotease 17*) possédant une activité α-sécrétase et plusieurs modulateurs du métabolisme de l'APP (*APH1B*, *ADAMTS1*, *ADAMTS4* et *SORL1*) ont été associés aux formes sporadiques. De plus, l'immunité innée et en particulier l'activation des microglies semblent être des processus extrêmement importants dans le développement des formes sporadiques de la MA. Un point intéressant est que le variant rs72824905 (Pro522Arg) du gène de la *PLCG2* (phospholipase C-gamma 2), une protéine impliquée dans la transduction de signaux immunitaires, notamment dans les microglies, est un variant protecteur (van der Lee et al., 2019).

Tableau 1 : Liste et fonctions des variants génétiques associés aux formes sporadiques de la MA. Adapté de (Bellenguez et al., 2020a).

Gène	Chromosome	SNP	Fonctions
<i>CR1</i>	1	rs4844610	Inflammation
<i>CD33</i>	19	rs3865444	Inflammation
<i>EPHA1</i>	7	rs10808026	Inflammation
<i>MS4A</i>	11	rs7933202	Inflammation
<i>HLA</i>	6	rs9271058	Inflammation
<i>TREM2</i>	6	rs75932628	Inflammation
<i>INPP5D</i>	2	rs10933431	Inflammation
<i>PLCG2</i>	16	rs72824905	Inflammation
<i>CLNK</i>	4	rs6448453	Inflammation
<i>ABI3</i>	17	rs616338	Inflammation
<i>CLU</i>	8	rs9331896	Inflammation
			Métabolisme des lipides
<i>ABCA7</i>	19	rs3752246	Inflammation
			Métabolisme des lipides
<i>ECHDC3</i>		rs7920721	Métabolisme des lipides
<i>ECHDC3</i>	10	rs7920721	Métabolisme des lipides
			Métabolisme des lipides
<i>APOE</i>	19	rs429358/rs7412	Clairance de l'amyloïde
<i>ADAM10</i>	15	rs593742	Métabolisme de l'APP
<i>APH1B</i>	15	rs117618017	Métabolisme de l'APP
<i>ADAMTS4</i>	1	rs4575098	Métabolisme de l'APP
<i>ADAMTS1</i>	21	rs2830500	Métabolisme de l'APP
			Neurodégénération
<i>SORL1</i>	11	rs11218343	Trafficking et métabolisme de l'APP
			Endocytose
<i>BIN1</i>	2	rs6733839	Endocytose
<i>PICALM</i>	11	rs3851179	Endocytose
<i>CD2AP</i>	6	rs9473117	Endocytose
<i>SCIMP/RABEP1</i>	17	rs113260531	Endocytose
<i>FERMT2</i>	14	rs17125924	Adhésions focales
			Fonctions synaptiques
<i>PTK2B</i>	8	rs73223431	Fonctions synaptiques
<i>CNTNAP2</i>	7	rs114360492	Fonctions synaptiques
<i>TSPOAP1</i>	17	rs2632516	Fonctions synaptiques
<i>ZCWPW1/NYAP1</i>	7	rs12539172	Régulation épigénétique
<i>OARD1</i>	6	rs114812713	Régulation épigénétique
<i>KAT8</i>	16	rs59735493	Régulation épigénétique
<i>CASS4</i>	20	rs6024870	Transport axonal
			Cytosquelette
<i>CELF1/SPI1</i>	11	rs3740688	Transport axonal
			Cytosquelette
<i>MAPT</i>	17	rs2732703	Pathologie Tau
<i>FRMD4A</i>	10	rs7081208/rs2446581 /rs17314229	Sécrétion de Tau
			Polarité cellulaire
<i>WWOX/MAF</i>	16	rs62039712	Facteurs de transcription
<i>HESX1</i>			Facteurs de transcription
<i>IL17RD</i>	3	rs184384746	Inflammation
<i>APPL1</i>			Endocytose
<i>ACE</i>	17	rs138190086	Conversion de l'angiotensine
<i>SLC24A4/RIN3</i>	14	rs12881735	Développement neuronal
<i>TM2D3</i>	15	rs139709573	Signalisation Notch
<i>ALPK2</i>	18	rs76726049	Suppresseur de tumeur
<i>IQCK</i>	16	rs7185636	Non connue
<i>AC074212.3</i>	19	rs76320948	Non connue

b) Facteurs de risques non-génétiques

-Le facteur de risque le plus important pour les formes sporadiques est l'**augmentation de l'âge**. En effet, la MA touche principalement les personnes de plus de 65 ans. Néanmoins, la MA ne fait pas partie du vieillissement normal et l'augmentation de l'âge seule n'est pas suffisante pour causer la MA.

-Un **niveau d'éducation élevé** permet de préserver les capacités cognitives et de renforcer sa résilience cognitive et, réciproquement, un faible niveau d'éducation est un facteur de risque pour la MA.

-Le **sexe** est aussi un paramètre important. Les femmes ont un risque significativement plus élevé de développer la MA (Laws et al., 2018). D'ailleurs le risque de développer la MA à cause de l'allèle APOE ϵ 4 est également plus important chez les femmes que chez les hommes (Altmann et al., 2014). La raison de ces différences semble être d'origine hormonale, puisque qu'il a été trouvé que chez les femmes, la MA était fortement liée au statut ménopausique, avec un risque plus élevé en période postménopausique, et lié au traitement hormonal substitutif, avec un risque réduit en cas de prise d'hormones de substitution (Rahman et al., 2020). En effet, une récente méta-analyse de la littérature a conclu que la prise d'estrogènes chez la femme postménopausée permet de réduire les risques de développer la MA (Song et al., 2020b).

- La fumée des cigarettes, les pesticides, et la pollution aux particules fines et aux métaux sont considérés comme des **facteurs de risque de la MA environnementaux**.

- Le **style de vie**, la consommation élevée d'alcool, les régimes alimentaires (riches en lipides et en sel) considérés comme néfaste pour la santé cardio-vasculaire, le manque d'activité cognitive et physique, et le manque de sommeil sont également considérés comme des facteurs de risque de la MA.

- Plusieurs **pathologies** tels que les traumatismes crâniens, les dégâts de la BHE, les infections virales (virus de l'herpès), le stress chronique, l'hypertension, l'hypercholestérolémie, l'obésité et le diabète de type 2 (DT2) peuvent contribuer au développement de la MA. Ainsi, le DT2 est causé par une diminution de la sécrétion d'insuline et/ou une insulino-résistance (IR), ce qui provoque une hyperglycémie. Ce sont l'IR et l'hyperglycémie chronique qui peuvent entraîner des complications, et qui constituent un facteur de risque important pour la MA. Une méta-analyse a estimé que les patients avec un DT2 ont 56% de risques en plus de développer une MA sporadique (Gudala et al., 2013).

En résumé, les facteurs de risque des formes sporadiques de la MA sont multiples et interagissent entre eux. Parmi ces facteurs de risques, certains sont considérés comme modifiables, et représentent des leviers d'actions permettant de réduire les risques de développer une MA et parmi ces facteurs modifiables, certains ont un impact différent selon le sexe du sujet (*Figure 10*).

Modifiable risk factors identified by The Lancet Commission (in bold , factors which were shown to be different in men and women)	Potential female-specific risk factors	Potential male-specific risk factors
<ul style="list-style-type: none"> • Lower level of education • Hypertension • Obesity • Hearing loss • Smoking • Depression • Physical inactivity • Social isolation • Diabetes • Excessive alcohol consumption • Traumatic Brain Injury • Air pollution 	<ul style="list-style-type: none"> • Age-related decline in female sex hormones • Early menopause • Pregnancies and pregnancy complications • Shorter reproductive period • Migraine • Traumatic Brain Injury by domestic violence 	<ul style="list-style-type: none"> • Androgen depleting treatments for prostate cancer • Age-related decline in male sex hormones (andropause)

Figure 10 : Liste des facteurs de risque modifiables et facteurs de risque dépendants du sexe. World Alzheimer Report 2021 (<https://www.alzint.org/u/World-Alzheimer-Report-2021.pdf>).

3) Dysfonctions moléculaires de la MA

a) *Dysfonctions synaptiques*

Dans la MA, la **diminution de la plasticité synaptique** et la **perte de synapses** sont précoces, ce qui pourrait faire des dysfonctions synaptiques le lien entre le développement des altérations amyloïdes et Tau, et les symptômes cognitifs cliniques. L'agrégation de l'A β oligomérique (A β) en plaque est capable de s'associer aux synapses et de provoquer une perte synaptique (Koffie et al., 2009). D'ailleurs, la protéine APOE4 s'associe avec l'A β et promeut sa localisation à la synapse et la perte de synapse (Koffie et al., 2012). La plasticité neuronale est définie comme l'ensemble des modifications morphologiques et fonctionnelles des synapses permettant une adaptation aux stimuli reçus. Une de ces modifications, la potentialisation à long terme (LTP), associée au processus d'apprentissage et de mémorisation, est un renforcement de la force d'une synapse, tandis que la dépression à long terme (LTD) est une réduction de la force d'une synapse et est plutôt associée à l'oubli. La LTP comme la LTD dépendent, au niveau du neurone postsynaptique, de l'activation des NMDAR (récepteurs NMDA activés par le glutamate). Durant la LTP, l'activation des NMDAR provoque une élévation importante mais transitoire de la concentration en Ca²⁺, et une augmentation de la densité synaptique en récepteurs AMPA (α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid) (Ju and Zhou, 2018). A l'inverse, la LTD est caractérisée par une diminution de la densité synaptique en récepteurs AMPA. Dans la MA, des niveaux élevés d'A β provoquent une suractivation des NMDAR par le glutamate, provoquant leur désensibilisation, une réduction de l'augmentation massive de Ca²⁺ postsynaptique et de l'induction de la LTP mais favorisant celle de la LTD (Martinen et al., 2018). Les épines dendritiques sont des petites protubérances structurellement très dynamiques de la membrane dendritique, constituant la partie postsynaptique de la synapse. Les changements morphologiques des épines dendritiques sont un des mécanismes de la plasticité synaptique, la LTP étant associée à un élargissement de la synapse due à une épine dendritique adoptant une forme plus mature et stable, avec une large tête en forme de champignon (épines « mushrooms »), alors que la LTD est associée à un rétrécissement de la synapse due à une contraction de l'épine dendritique (Reza-Zaldivar et al., 2020). Des **altérations de la morphologie des épines dendritiques** ainsi que la **perte d'épines** sont corrélées avec les altérations cognitives des patients Alzheimer, et ce, même avant la formation des plaques amyloïdes et de la mort des neurones. Par exemple, l'application d'A β sur des cultures de neurones hippocampiques ou des coupes organotypiques hippocampiques de souris provoque une diminution du nombre d'épines

« mushrooms » et une augmentation du nombre d'épines dendritiques de morphologie immature (Ortiz-Sanz et al., 2020). Il a été récemment rapporté dans des cultures primaires de neurones, que l'A β provoque une stabilisation aberrante de l'actine au niveau des épines dendritiques, ce qui empêche leur remodelage morphologique (Rush et al., 2018). *In vivo*, les souris APPswe présentent dès l'âge de 3 mois, une réduction du nombre de la densité en épines dendritiques dans l'hippocampe, de leur longueur et donc de l'influx synaptique dans cette zone (Lee et al., 2021a). Enfin, une perte de synapses et d'épines dendritiques est présente dans plusieurs régions du cerveau des patients Alzheimer, dont le cortex (Boros et al., 2017) et l'hippocampe (Chen et al., 2018).

b) Neuroinflammation chronique

Le phénotype de la **neuroinflammation chronique** associé à la MA implique principalement les microglies et les astrocytes. Les microglies sont des cellules de l'immunité innée, des macrophages résidant dans le cerveau. La réponse neuroinflammatoire n'est pas en elle-même pathologique, c'est plutôt son maintien dans la durée, sa chronicité, qui est néfaste dans la MA. En effet, une neuroinflammation aigüe est une réponse physiologique aidant le cerveau à faire face à différents stress tels que les infections, les traumatismes, les ischémies ou les toxines (DiSabato et al., 2016). Les microglies au repos (dites « homéostatiques ») sont ubiquitairement distribuées dans le cerveau et le sondent continuellement avec leurs prolongements. En cas de détection d'une substance pathogène (débris cellulaires, espèces de l'A β), les microglies vont s'activer (microgliose) via leurs récepteurs DAMPs/PAMPs (danger or pathogen associated molecular patterns) (Heneka et al., 2015). Activée, la microglie réduit le nombre et la longueur de ses prolongements pour adopter une morphologie amiboïde, internalise par pinocytose, phagocytose ou endocytose médiées par des récepteurs, les substances pathogènes, essaie de les dégrader par plusieurs voies, et secrète des cytokines pro-inflammatoires (IL (interleukine)-1 β , IL-6, TNF- α (tumeur necrosis factor α), des chémokines (CCL1, CCL5, CXCL1) et de l'acide nitrique (NO). Cela permet également d'activer et de recruter d'autres microglies au site d'intérêt (autour d'une plaque sénile par exemple). Selon le paradigme M1-M2 (dont la trop grande simplicité a été remise en question (Martinez and Gordon, 2014)), une microglie activée peut adopter un phénotype M1 pro-inflammatoire ou M2 anti-inflammatoire. En condition physiologique, cette activation cesse une fois le stimulus éliminé, mais dans les MND comme la MA, l'activation de la microglie perdure, provoquant une **neuroinflammation chronique** participant à l'amplification de la MA (Leng and Edison, 2021). Le modèle de la cinétique de la microgliose au cours de la progression de la MA (*Figure 11*) propose une activation microgliale primaire et bénéfique durant la phase préclinique de la MA médiée par les microglies de phénotype M2, évoluant au cours de la maladie vers une stimulation chronique des microglies favorisant leur activation en type proinflammatoire M1 et causant une activation secondaire néfaste provoquant des dégâts aux neurones (Leng and Edison, 2021). Ce modèle permet également d'expliquer pourquoi les patients avec des dysfonctions microgliales (acquises ou dues aux facteurs de risques comme *TREM2* (triggering receptor expressed on myeloid cells 2) ou *CD33*) vont avoir une phase préclinique qui va évoluer plus rapidement vers des symptômes cliniques. En effet, chez ces individus, la réponse protectrice primaire pourrait être plus faible, réduisant ainsi la clairance de l'A β , qui, en persistant à des niveaux élevés cause un basculement plus rapide des microglies en phénotype M1. S'ensuit alors la réaction secondaire néfaste qui serait alors plus précoce et plus intense. Ainsi, le type de réaction microgliale pourrait expliquer les différences de susceptibilités entre individus à développer la MA, et pourrait expliquer l'hétérogénéité des durées des phases précliniques et des vitesses de déclin cognitif. Cependant, il a récemment été mis en évidence par l'étude des profils transcriptomiques à l'échelle de la microglie unique, la présence d'un autre sous-type de microglies chez la souris et l'humain : les DAM (disease-associated microglia) (Keren-Shaul et al., 2017). Ce sont des microglies activées dans la MA et définies par un certain nombre de gènes avec une expression réduite et d'autres avec une expression augmentée (*APOE* et *TREM2* par exemple) et dont l'activation complète dépend de *TREM2*. Cette sous-population « DAM » s'enrichit au cours de la progression de la MA chez les souris 5xFAD (APPswe, Florida (I716V), et London (V717I), et PS1

(M146L) (L286V)), mais sans être corrélée avec la neurodégénération (Keren-Shaul et al., 2017; Sobue et al., 2021). Les « DAM » ont une action bénéfique car elles sont capables de phagocytter les plaques amyloïdes.

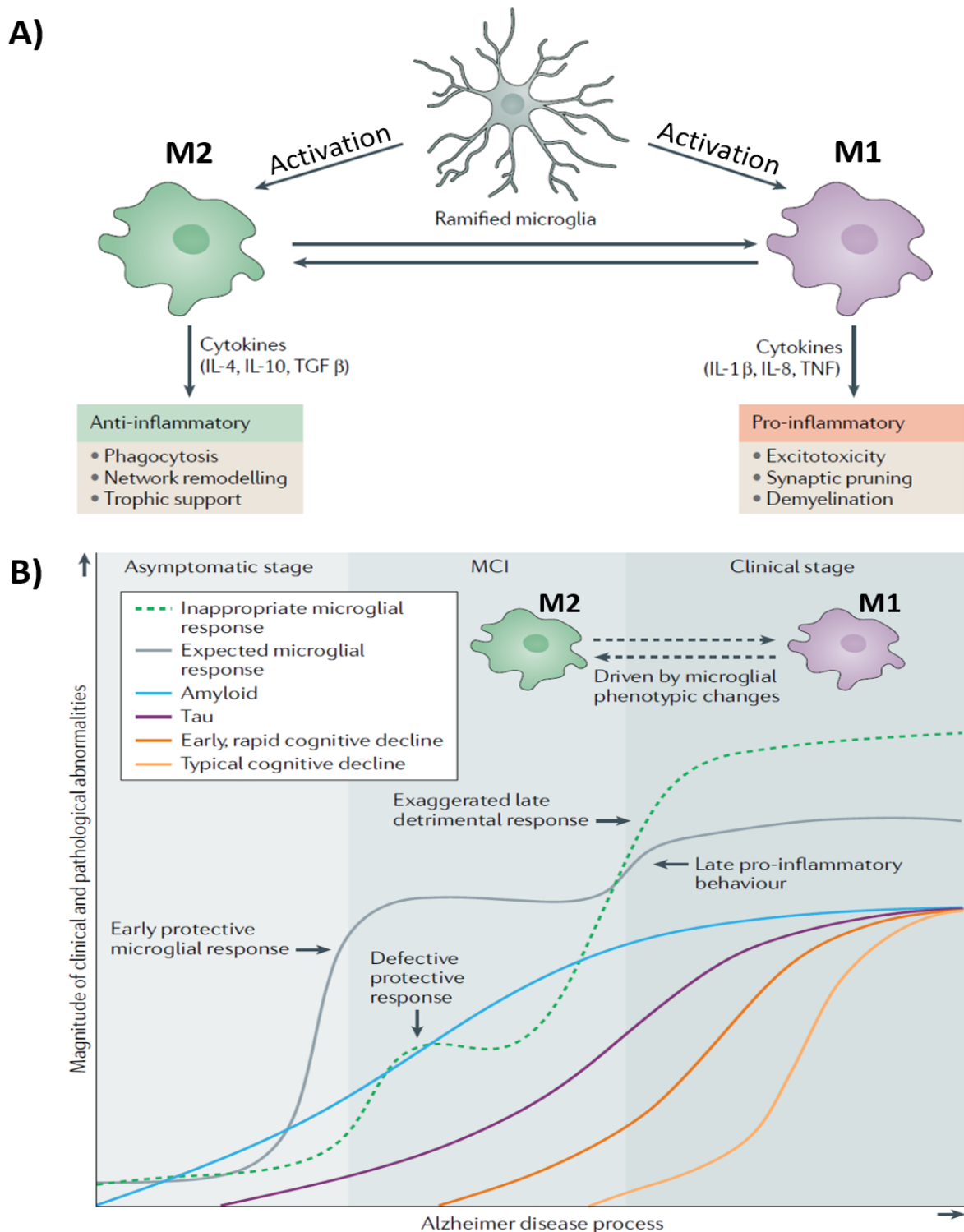


Figure 11 : Les modifications phénotypiques des microglies activées et la cinétique de la microglie au cours de la progression de la MA. Adapté de (Leng and Edison, 2021). A) La microglie adopte des modifications phénotypes et fonctionnelles lors de son activation. B) Modèle de la cinétique de l'activation des microglies au cours de la progression de la MA. Selon ce modèle, un patient avec des capacités microgliales non altérées (courbe grise) va produire une réaction microgliale précoce protectrice mais le maintien de l'activation des microglies va favoriser le phénotype de microglies pro-inflammatoires. Un patient avec des capacités microgliales altérées (courbe en pointillés verts) aura une réaction protectrice atténuée puis une réaction délétère tardive exacerbée.

Les astrocytes sont des cellules gliales participant au maintien de la BHE, au support trophique des neurones et des synapses. Durant la MA, l'accumulation de l'A β et la libération des cytokines proinflammatoires par les microglies M1 conduit à l'activation des astrocytes (astrogliose). L'astrogliose est caractérisée par l'augmentation de l'expression des protéines des filaments intermédiaires, GFAP (glial fibrillary acidic protein) et VIM (vimentine). Les astrocytes activés participent à la dégradation et à la clairance de l'A β , principalement en sécrétant de l'APOE (Mathur et al., 2015; Thal, 2012). D'ailleurs, atténuer l'activation des astrocytes par déplétion génétique de GFAP et VIM chez des souris APP^{swe}/PS1 Δ E9 (APP/PS1) double la charge en plaques amyloïdes (Kraft et al., 2013). Mais les astrocytes activés peuvent également renforcer la neuroinflammation en produisant des cytokines proinflammatoires et des chémokines et du NO (Parpura et al., 2012). Les astrocytes activés de type pathologique A1 (par analogie avec les microglies activées M1 et M2) sont enrichis dans les cerveaux des patients atteints de la MA et les microglies jouent un rôle important dans leur activation. En effet, la sécrétion d'IL-1 β , TNF et C1q (molécule du complément), ou de mitochondries fragmentées et dysfonctionnelles par les microglies activées sont capables d'activer des astrocytes naïfs en astrocytes A1 (Joshi et al., 2019; Liddel et al., 2017). Ces types d'astrocytes A1 sont caractérisés par la perte de leurs fonctions dans la survie neuronale et la synaptogenèse, la perte de leur capacité de phagocytose et par leur capacité à induire la mort des neurones et des oligodendrocytes (Liddel et al., 2017). Néanmoins, les résultats de transcriptomique plus récents concluent que les astrocytes activés sont une population hétérogène qui ne peut pas être entièrement réduite à deux sous-populations et que leurs profils transcriptomiques dépendent du stade de la maladie (Escartin et al., 2021). L'activation des astrocytes se fait majoritairement via la voie de signalisation JAK2 (janus tyrosine kinase 2)-STAT3 (signal transducers and activators of transcription 3). Cependant, chez des souris APP/PS1, c'est l'inhibition de cette voie d'activation qui est capable de réduire les dépôts amyloïdes via l'augmentation de sa clairance par les microglies, d'améliorer les défauts synaptiques et l'apprentissage spatial (Ceyzeriat et al., 2018; Reichenbach et al., 2019). De plus, l'augmentation du nombre d'astrocytes sénescents associée à l'accumulation et l'internalisation de Tau oligomérique participerait aussi à la pathologie de la MA (Gaikwad et al., 2021). Ainsi, les astrocytes sénescents vont sécréter des cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α) mais également le facteur HMGB1 (high mobility group box 1) qui va induire la sénescence des cellules environnantes (Gaikwad et al., 2021).

La **neuroinflammation chronique** et pathologique de la MA est également caractérisée par la perméabilisation de la BHE et une infiltration de cellules immunitaires périphériques dans le cerveau (macrophages et lymphocytes T) (C and Lynch, 2020). Les macrophages infiltrés ont été décrits comme ayant une action bénéfique en aidant à la clairance des plaques amyloïdes chez des modèles murins de la MA et d'angiopathie amyloïde (Hawkes and McLaurin, 2009; Simard et al., 2006). La présence de lymphocytes T a été rapportée dans le cerveau de patients Alzheimer (Togo et al., 2002) et leur implication dans l'augmentation de l'activation gliale et les dépôts amyloïdes a été observée chez des souris APP/PS1 (Browne et al., 2013; McManus et al., 2014). Néanmoins, le type de lymphocytes T a son importance, car les lymphocytes T régulateurs semblent avoir une action bénéfique dans chez souris APP/PS1 sur le recrutement des microglies aux plaques et les capacités cognitives (Dansokho et al., 2016). A l'inverse les lymphocytes T effecteurs Th1 et Th17, par leur production de cytokines proinflammatoires interféron γ (IFN- γ), IL-17 et TNF- α , augmentent la pathologie amyloïde, la neuroinflammation et les déficits cognitifs (Browne et al., 2013; Cristiano et al., 2019).

C) Le métabolisme de l'APP

Chez l'humain, le gène *APP* se situe sur le chromosome 21 et code pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), une glycoprotéine transmembranaire de type 1. Il existe trois isoformes de l'APP après épissage alternatif, dénommées en fonction du nombre d'acides aminés de l'isoforme : l'APP₇₅₁, l'APP₇₇₀ et l'APP₆₉₅ qui est l'isoforme neuronale. Structuellement (*Figure 12*), l'APP₆₉₅ possède une

séquence peptide signal formée par ses 17 premiers résidus qui permet la traduction de l'APP au niveau du RE. L'APP transite ensuite par l'appareil de Golgi où il mature en gagnant plusieurs modifications post-traductionnelles (MPT) comme des N- et O-glycosylations, des sialylations, des phosphorylations et des sulfatations (Coburger et al., 2014). L'APP est ensuite transportée sous sa forme mature jusqu'à la membrane plasmique et est, par la suite, internalisée dans les endosomes (pour être clivée dans différentes voies protéolytiques (*décrites plus loin*). La partie N-terminal extracellulaire de l'APP contient un domaine globulaire E1, un domaine d'extension (ED), un sous-domaine acide (AcD), un sous-domaine KPI (Kunitz protease inhibitor) et un domaine E2 riche en hélices (aussi appelé central APP domain (CAPPD)) et une région juxtamembranaire (JMR). L'APP contient la séquence de l'A β et un domaine transmembranaire (TM) qui traverse la membrane plasmique. Enfin la partie C-terminale intracellulaire est constituée de l'AICD (APP intracellular domain). Il existe chez l'humain deux homologues de l'APP : *APLP1* et *APLP2* (amyloid precursor-like protein 1 et 2), également présents dans le cerveau, de structure proche de l'APP (*Figure 12*) et qui peuvent également être métabolisés par les mêmes sécrétases impliquées dans le métabolisme de l'APP (Eggert et al., 2004). Néanmoins, une différence majeure entre ces membres de la famille des protéines APP est que seul l'APP possède la séquence de l'A β et peut donc être le précurseur du peptide A β (Walsh et al., 2007). Le métabolisme ou plus exactement la protéolyse/clivage de l'APP se déroule selon différentes voies dites canoniques (voies non-amyloïdogène et amyloïdogène) ou non-canoniques (les autres voies de clivages).

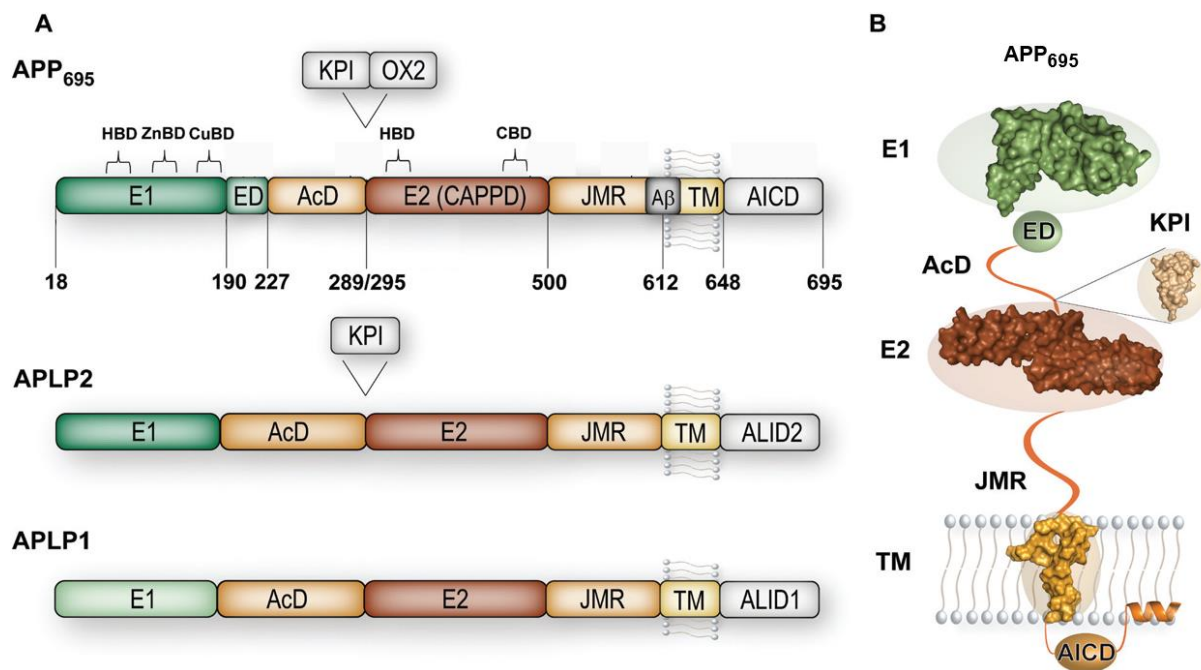


Figure 12 : Structures des membres de la famille des protéines APP. Adapté de (Coburger et al., 2014). A) Domaines de l'APP695 après clivage du peptide signal (les 17 premiers résidus N-terminaux). B) Structure des deux domaines globulaires E1 et E2, de la partie transmembranaire et du domaine Kunitz protease inhibitor (KPI) des deux plus longues isoformes d'APP, déterminés à partir d'analyses cristallographiques ou par résonance magnétique nucléaire.

1) Voie non-amyloïdogène

La voie non-amyloïdogène est la voie de clivage de 90% des APP matures en condition physiologique (*Figure 13*). Le premier clivage de la voie s'effectue par l' α -sécrétase à la membrane plasmique. Le clivage a lieu dans la partie extracellulaire de la séquence A β , entre les acides aminés Lys612 et Leu613 (les 16^{ème} et 17^{ème} résidus de l'A β). Plusieurs protéases membres de la famille des ADAM (ADAM9, ADAM10 et ADAM17) ont une activité α -sécrétase (Thinakaran and Koo, 2008), ADAM10 étant la

plus importante dans le cerveau. Les deux produits du clivage de l'APP par l' α -sécrétase sont : un fragment extracellulaire soluble (APPs- α) et un fragment C-terminal (CTF) de 83 résidus (le CTF α ou C83) ancré dans la membrane plasmique. Le C83 peut par la suite être clivé par le complexe γ -sécrétase (composé d'au moins PS1 ou PS2, PEN-2 (presenilin enhancer 2), la nicastrine et APh-1 (anterior pharynx defective-1)) présent à la membrane plasmique ou dans les endosomes. Le clivage de la γ -sécrétase a lieu dans la portion de l'APP traversant les membranes et produit un court fragment N-terminal de 3kDa appelé P3 (ou A $\beta_{17-40/42}$) et le fragment APP-CTF : AICD.

2) Voie amyloïdogène

Suite à son internalisation dans les endosomes, l'APP mature peut être clivé par la β -sécrétase (*Figure 13*). En effet, la β -sécrétase ou BACE-1 (β -site APP cleaving enzyme 1) est une aspartyl-protéase transmembranaire de type 1 principalement active dans les environnements acides comme les endosomes. Un fait important est qu'il existe deux sites de clivages par la β -sécrétase sur l'APP. Le site dit β se situe entre la Met596 et le 1^{er} résidu de l'A β , l'Asp597. Cette coupure β produit en N-terminal le fragment soluble (APPs- β) sécrété et un fragment C-terminal (CTF) de 99 résidus (le CTF β ou C99) ancré dans la membrane endosomale. Le C99 peut par la suite être clivé par le complexe γ -sécrétase de l'endosome pour générer un peptide de longueur variable (A β_{1-x}) selon le site de clivage par la γ -sécrétase et générer le fragment AICD. Il existe trois sites majeurs de clivage par la γ -sécrétase sur le C99 : le site γ produisant de l'A β_{1-40} ou de l'A β_{1-42} , le site ζ produisant de l'A β_{1-46} et le site ϵ produisant de l'A β_{1-49} (Xu, 2009). Il est à noter qu'en condition physiologique, c'est l'espèce A β_{1-40} qui est majoritairement sécrétée, et bien que minoritaires, ce sont les espèces plus longues qui sont plus prônes à s'agréger en fibrilles amyloïdes. Le peptide A β est sécrété hors de la cellule où l'espèce A β_{1-42} , hydrophobe va s'oligomériser pour former des plaques amyloïdes. De plus, les A $\beta_{1-40/42}$ peuvent également être tronqués de 2 à 11 résidus en N-terminal, une région de nature hydrophile, ce qui a pour conséquence d'augmenter l'hydrophobicité de ces espèces de l'A β et donc leur capacité à s'agréger (Larner, 1999). Le C99 est également un précurseur du C83 car il peut être clivé par l' α -sécrétase de la voie non-amyloïdogène. Mais la β -sécrétase peut aussi cliver l'APP sur un site, dit β' , onze résidus après le site β , générant un APPs β' un peu plus long et le CTF-C89 qui peut également être clivé par la γ -sécrétase, ce qui produit un ratio A $\beta_{11-42/40}$ plus élevé que le ratio A $\beta_{1-42/40}$ du clivage du C99 (Siegel et al., 2017).

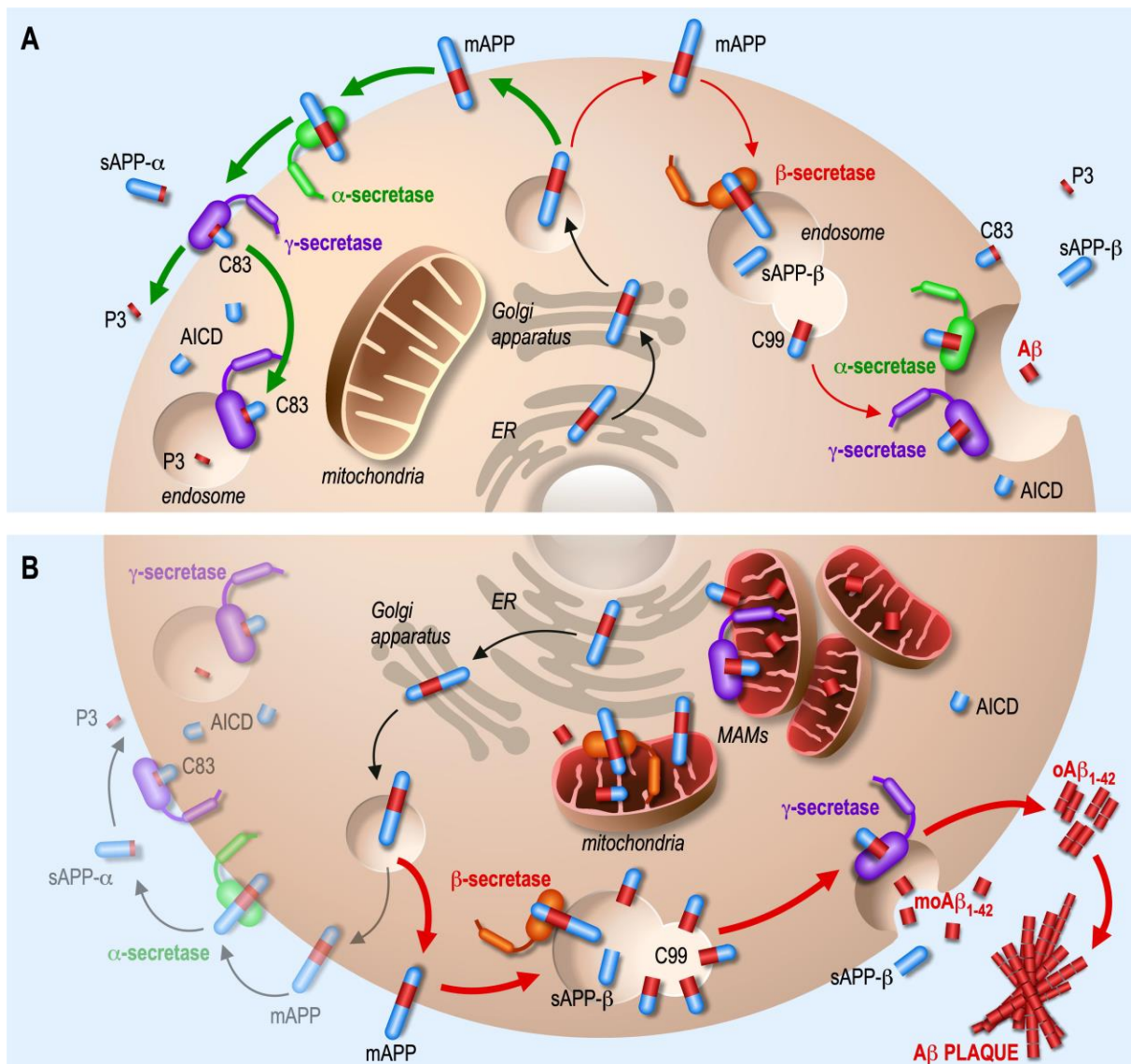


Figure 13 : Les deux voies de clivages canoniques de l'APP : la voie non-amyloïdogène et la voie amyloïdogène. Figure de la revue en Annexe 2. A) En condition physiologique, le clivage de l'APP par la voie non-amyloïdogène (flèches vertes) est majoritaire par rapport à la voie amyloïdogène (flèches rouges). B) Dans la MA, l'APP est principalement clivée dans la voie amyloïdogène.

3) Voies de clivages non-canoniques

-La voie de la η -sécrétase (Figure 14). L'activité de cette sécrétase est assurée par la métalloprotéase MT5-MMP (membrane-bound matrix metalloproteinase) qui clive l'APP mature entre l'Asp504 et la Met505, générant un fragment N-terminal soluble APPs- η d'environ 80kDa et un fragment CTF η d'environ 30 kDa (Willem et al., 2015). Le CTF η peut être clivé par l' α -sécrétase pour générer l'A η - α et le C83 ou par la β -sécrétase pour générer l'A η - β et le C99. De plus, la MT5-MMP, indépendamment de son activité de protéase, interagit avec le C99, favorise sa localisation endosomale et donc favorise la voie amyloïdogène (García-González et al., 2021). Il est à noter qu'une accumulation de CTF η a été rapportée dans les neurites dystrophiques dans les cerveaux de patients atteints de la MA et que le peptide A η - α réduit l'activité des neurones hippocampiques de souris et perturbe la LTP *in vitro* et *in vivo* (Mensch et al., 2021; Willem et al., 2015). De plus, une étude a rapporté que le CTF η est l'APP-CTF majoritaire dans le LCR de patients, dont le niveau est augmenté par rapport aux contrôles dans les cas sporadiques et plus encore dans les cas avec des mutations autosomiques dominantes dans *PS1* (García-Ayllón et al., 2017).

-La voie de la **δ -sécrétase** (Figure 14). L'activité de cette protéase est assurée par l'asparagine endopeptidase (AEP) présente dans les endolysosomes, qui clive l'APP mature après l'Asp373 et/ou l'Asp585, pouvant générer quatre fragments : les fragments N-terminaux solubles APPs δ_{1-373} et APPs δ_{1-585} et APPs $\delta_{373-585}$ et le CTF δ (APP $\delta_{586-695}$). Ce APPs $\delta_{373-585}$ et CTF δ peuvent également être par la suite clivés par l' α et la β -sécrétase. Le clivage de l'APP mature par l'AEP en Asp585 est important car le CTF δ se lie plus fortement à BACE-1 que l'APP et augmente la production de l'A β (Zhang et al., 2015). Les niveaux d'AEP active et d'APPs δ_{1-373} , APPs δ_{1-585} et de CTF δ sont tous augmentés dans des cerveaux de patients Alzheimer et la délétion du gène de l'AEP ou l'inhibition pharmacologique de l'activité de l'AEP dans des modèles de souris 5xFAD ou Tau(P301L) permet d'améliorer les dégâts synaptiques (perte synaptique, perte de densité en épines dendritiques et diminution de la LTP) (Zhang et al., 2015). De plus, d'une manière similaire à l'AICD (voir plus loin), le CTF δ est capable d'être transloqué dans le noyau et de s'associer à la protéine Fe65 et au facteur de transcription CEBPB (CCAAT/enhancer-binding protein beta) pour stimuler son activité de transcription (Yao et al., 2021). Parmi les cibles de CEBPB se trouve l'AEP, l'APP, Tau, et les gènes des cytokines proinflammatoires IL-6 et IL-1 β (Yao et al., 2021).

-La voie de la **Meprin- β** (Figure 14). La métalloprotéase Meprin- β est capable de cliver l'APP mature en trois sites de clivages (Ser124/Asp125, Glu380/Thr381 et Gly383/Asp384) pour générer les fragments APPs $_{1-124}$, APPs $_{1-305/308}$, APPs $_{1-124}$, APPs β^* (identique à l'APPs β avec un résidu de plus en C-terminal) et le CTF β^* (identique au CTF β avec un résidu en moins en N-terminal). Le CTF β^* peut être clivé par la γ -sécrétase et produire un peptide A β_{2-x} (Jefferson et al., 2011). Bien que les fragments N-terminaux de l'APP issu des clivages par la Meprin- β semblent non toxiques *in vitro* (Jefferson et al., 2011), l'A β_{2-40} produit après le clivage du CTF β^* par la γ -sécrétase est plus prône à s'agréger (Schönherr et al., 2016).

-La voie des **caspases** (Figure 14). Des caspases peuvent également cliver l'APP mature après le résidu Asp664 dans le domaine AICD, générant le peptide intracellulaire C31 qui peut être clivé par la γ -sécrétase pour produire le peptide Jcasp. Le fragment C31 semble être impliqué dans la perte synaptique et la mort neuronale (Nhan et al., 2015), et le fragment Jcasp dans l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs présynaptiques (Fanutza et al., 2015).

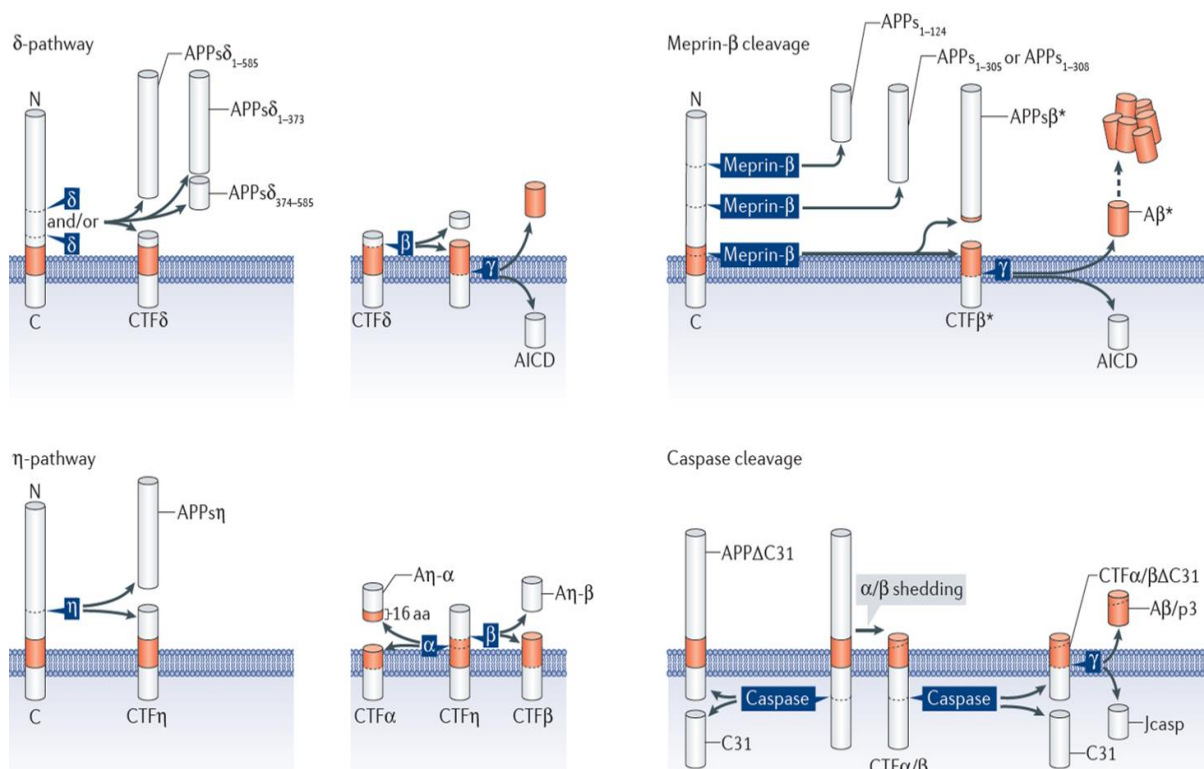


Figure 14 : Les voies de clivages non-canoniques de l'APP. (Müller et al., 2017).

4) Les métabolites de l'APP : fonctions physiologiques et toxicités

a) Les fragments APPs- α et APPs- β

L'APPs- α soluble et sécrété possède des propriétés neurotrophiques (différenciation neurale et croissance axonale) et neuroprotectrices (Habib et al., 2017). En effet, ce fragment semble capable d'améliorer la plasticité synaptique et la cognition *in vivo* car chez des souris double KO (knock-out) pour APP et APLP2, l'APPs- α est capable de contrer les défauts de LTP et les défauts de mémoire (Hick et al., 2015). Un autre article a étudié l'impact d'APPs- α dans les souris modèles de la MA APP/PS1 Δ E9, et a conclu que le fragment restaurait la plasticité synaptique et les capacités de mémoire des souris (Fol et al., 2016). Mais il y avait également dans ces souris une réduction de l'A β soluble et en plaque, dû à une stimulation de sa clairance, via le recrutement des microglies et via l'augmentation des niveaux de TREM2 et de l'IDE (Fol et al., 2016). De plus, l'APPs- α est également un inhibiteur endogène de l'activité de BACE-1, via la liaison d'APPs- α sur le site allostérique de BACE-1 (Peters-Libeu et al., 2015). Enfin, l'APPs- α est également capable d'inhiber la GSK3 β (glycogen synthase kinase-3 β) et donc la phosphorylation de Tau, un effet qui semble être dépendant de BACE-1 (Deng et al., 2015).

Comme l'APPs- α , l'APPs- β est soluble et sécrété dans le milieu extracellulaire, mais possède seize résidus en moins en C-terminal. L'APPs- β possède aussi des propriétés neurotrophiques pour la croissance axonale (Chasseigneaux et al., 2011) et des propriétés neuroprotectrices contre l'excitotoxicité, la carence en glucose et contre la toxicité de l'A β mais elles sont bien moins importantes (d'un facteur 100 environ) que les propriétés neuroprotectrices de l'APPs- α (Barger and Harmon, 1997; Furukawa et al., 1996). Néanmoins, l'APPs- β est capable de moduler la transmission synaptique en se liant, à la synapse, à la sous-unité 1a du récepteur GABAB (gamma-aminobutyric acid type B) (Rice et al., 2019). Cette interaction augmente la facilitation synaptique à court-terme et diminue l'activité neuronale via l'inhibition de la libération des neurotransmetteurs *in vivo* (Rice et al., 2019).

b) Les fragments APP-CTFs (C83 et C99)

Les fonctions et la toxicité du C83 n'ont pas été étudiées de façon très approfondie. Il a été rapporté que la conversion du C99 en C83 par le clivage de l' α -sécrétase était bénéfique car il permet de passer d'une voie amyloïdogène produisant du C99 et de l'A β à une voie non-amyloïdogène ne produisant plus de l'A β et produisant le fragment C83 considéré comme non toxique (Jäger et al., 2009).

Le C99 est un fragment d'intérêt pour notre laboratoire. Nous avons décrit dans des modèles de souris 3xTgAD et des souris injectées en intra-cérébroventriculaire (ICV) avec des virus adéno-associés exprimant le C99 dans les neurones (AAV10-C99), que l'accumulation de C99 est la conséquence de sa moindre dégradation par le système lysoso-autophagique et qu'en plus, l'accumulation intraneuronale de C99, indépendamment de celle de l'A β , altère les fonctions lysoso-autophagiques (Lauritzen et al., 2016). Cet impact semble dû à la capacité du C99 à s'agréger dans les membranes des vacuoles des endosomes et lysosomes, et ainsi de perturber l'intégrité de ces membranes (Lauritzen et al., 2016). Cette conclusion a été renforcée dans des cerveaux de souris surexprimant l'APP (E693Q) à 12 mois où les CTFs (C99/C83) sont accumulés dans les lysosomes, ce qui s'accompagne d'une accumulation de lysosomes gonflés et d'une augmentation des marqueurs d'astroglie (GFAP) et de microglie (Iba1) dans l'hippocampe (Kaur et al., 2017). De plus, une étude a récemment conclu que dans le contexte de la T21, l'effet toxique sur les lysosomes de la présence en triple exemplaire du gène de l'APP était principalement dû au C99 (Jiang et al., 2019). Il se trouve que dans les fibroblastes de ces patients T21, le C99 s'accumule dans des lysosomes qui ont un pH significativement plus élevé, un phénotype qui disparaît en bloquant la production de C99 par un inhibiteur de la β -sécrétase. Notre équipe, ainsi que d'autres, avons détectés le C99 au niveau des domaines de contact entre le réticulum endoplasmique (RE) et les mitochondries connus sous le nom de mitochondria-associated membranes (MAMs). Ainsi,

notre laboratoire a rapporté la présence de, l'APP et des activités β - et γ -sécrétase dans ce microdomaine, expliquant la présence et l'accumulation des produits du clivage de l'APP, tel que l'A β et le C99. Le C99 accumulé dans les MAMs peut ainsi interagir avec des protéines importantes pour le fonctionnement du RE et de la mitochondrie, et peut ainsi perturber la fonction des mitochondries et des MAMs (Del Prete et al., 2017; Pera et al., 2017).

c) L'A β et le P3

La simple présence de peptide A β n'est ni automatiquement pathologique ni ne va inéluctablement déclencher une MA. C'est l'agrégation importante en plaques séniles (importante en nombre et en taille) du peptides A β qui est pathologique. Quant au peptide A β en lui-même, il est produit de manière physiologique tout au long de la vie (en des quantités faibles de l'ordre du picomolaire), et peut former de rares plaques amyloïdes au cours du vieillissement sans nécessairement être associées aux symptômes de la MA. Plusieurs mécanismes permettent même de se débarrasser d'une certaine quantité de l'A β . L'A β peut être internalisé dans les microglies et être dégradé de plusieurs façons, comme par exemple par le protéasome, dans les lysosomes ou par diverses protéases (Ries and Sastre, 2016). En effet, les monomères de l'A β peuvent être hydrolysés par plusieurs enzymes produites par les microglies, dont les deux principales sont l'enzyme dégradant l'insuline (IDE) (Qiu et al., 1998) et la néprilysine (NEP), et cette dernière pouvant aussi hydrolyser les oligomères de l'A β (Kanemitsu et al., 2003) mais cette enzyme voit son expression et son activité réduites dans la MA (Wang et al., 2010). Il est intéressant de constater qu'à l'inverse des nombreux effets toxiques de l'A β à des concentrations élevées (de l'ordre du nanomolaire voir du micromolaire), plusieurs études ont identifié des impacts bénéfiques de l'A β à des concentrations physiologiques (picomolaire). En effet, il semble que physiologiquement, l'A β n'est pas un déchet indésirable et inutile issu du clivage de l'APP, mais qu'il possède diverses fonctions physiologiques. Ces fonctions physiologiques seraient la neuroprotection (via l'activation d'HIF-1 α), une activité antimicrobienne, la capacité de colmater les brèches de la BHE, d'augmenter la plasticité synaptique, et de promouvoir la LTP dans l'hippocampe, ce qui favorise l'apprentissage et la mémoire (C. Crdenas-Aguayo et al., 2014; Morley et al., 2019). Et c'est peut-être justement quand les capacités d'un individu à éliminer l'A β ne sont plus capables de compenser sa production et son agrégation, que les effets physiologiques de l'A β disparaissent au détriment de ses effets toxiques à forte concentration.

Les propriétés du peptide P3 sont peu claires et parfois contradictoires (Kuhn and Raskatov, 2020) mais il a été récemment rapporté que le P3, qui est dépourvu des 16 premiers résidus de l'A β , partage des propriétés amyloïdogènes communes avec l'A β , car étant également capable de s'oligomériser et de former des fibrilles (Kuhn et al., 2020). Plus d'études sur les propriétés et les effets de ce P3 sont requises, car cette propriété d'agrégation suggérerait que la voie de l' α -sécrétase pourrait également être une voie potentiellement toxique.

d) L'AICD

Comme les fragments C83 et C99, l'AICD est également un APP-CTF, mais particulier, car est issu du clivage de la γ -sécrétase, n'est pas ancré dans des membranes et peut être généré à la fois dans la voie non-amyloïdogène et la voie amyloïdogène. Cependant, il semble que l'AICD soit principalement issu du clivage du C99 (Flammang et al., 2012), donc de la voie amyloïdogène. Du fait de sa localisation endosomale plutôt que plasmique, la voie amyloïdogène semble produire un AICD plus stable et transcriptionnellement actif (Bukhari et al., 2017). De toutes les espèces d'AICD différentes possibles, dû aux différents sites de clivage de la γ -sécrétase, les espèces majoritairement détectées sont les AICD₅₀ et AICD₅₁ (long de 50 et 51 résidus) issus du clivage sur le site ϵ de la γ -sécrétase (Pinnix et al., 2013). La question de la stabilité de l'AICD est importante car il est rapporté que l'AICD est rapidement clivé par l'IDE en de multiples sites (Edbauer et al., 2002; Venugopal et al., 2007), dégradé par le protéasome

(Gersbacher et al., 2013) et les lysosomes (Asai et al., 2011; Vingtdoux et al., 2007) et clivé par des caspases, ce qui produit le fragment C31 (Lu et al., 2000). Néanmoins, l'AICD issu de la voie amyloïdogène, plus stable, est capable d'agir en tant que facteur de transcription. En effet, l'AICD peut interagir avec la protéine adaptatrice Fe65 et le complexe AICD-Fe65 peut transloquer jusque dans le noyau où il forme avec l'histone acétyl-transférase Tip60, un complexe trimérique appelé AFT (AICD-Fe65-Tip60) (von Rotz et al., 2004). Parmi les gènes cibles directs dont l'expression est augmentée par l'AICD, on retrouve une protéine de la réponse UPR (unfolded protein response) du RE, CHOP (C/EBP homologous protein) (Takahashi et al., 2009), le suppresseur de tumeur p53 (Alves da Costa et al., 2006) et la NEP (Belyaev et al., 2009; Pardossi-Piquard et al., 2005). De plus, d'autres gènes ont leur expression régulée par l'AICD, dont l'*APP*, *BACE-1* et *GSK3 β* (von Rotz et al., 2004).

Pathologie mitochondriale dans la MA

A) Les fonctions physiologiques de la mitochondrie

1) Structure des mitochondries

Les mitochondries sont des **organites intracellulaires vitaux** pour le fonctionnement cellulaire, et elles sont présentes dans toutes nos cellules, à l'exception des globules rouges. Structurellement, une mitochondrie est composée de deux membranes phospholipidiques, une membrane externe (MME) exposée au cytoplasme, et une membrane interne (MMI) délimitant la matrice mitochondriale. La MME est une simple bicouche de phospholipides de 6 à 7,5nm d'épaisseur, plutôt poreuse puisque les ions, les métabolites, les nucléotides et autres molécules non chargées peuvent la traverser à travers des protéines porines, telle que VDAC (voltage-dépendant anion channel). La MMI a une composition très différente, avec environ trois fois plus de protéines que de lipides (dont un spécifique, la présence de la cardiolipine (CL)), et l'absence des porines, ce qui la rend imperméable aux ions et molécules. La MMI forme des invaginations tortueuses dans la matrice, nommées crêtes mitochondriales, permettant d'augmenter sa superficie et l'insertion des protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (CRM). Entre les deux membranes se situe l'espace inter-membranaire (EIM). La matrice mitochondriale contient, entre autres, des ribosomes mitochondriaux et le génome mitochondrial sous forme de molécules d'ADNmit circulaires. Chaque mitochondrie possède entre 2 à 10 molécules d'ADNmit portant 37 gènes sans introns, codant pour 2 ARN ribosomiques (ARNr) mitochondriaux, 22 ARN de transfert et 13 sous-unités de la CRM. L'origine de réplication se situe dans une région non codante nommée *D-loop* qui possède une structure triple brin. Les autres protéines constituant la mitochondrie sont codées par l'ADN génomique (ADNg) (environ 98% des protéines mitochondriales dont plus de 70 protéines de la CRM). Les protéines mitochondriales codées par l'ADNg possèdent une MTS (mitochondrial targeting sequence) et sont transportées à travers le complexe de translocation de la MME (le complexe TOMM composé d'au moins sept protéines : TOMM5, TOMM6, TOMM7, TOMM20, TOMM22, TOMM40 et TOMM70)) et de la MMI (TIMM23), jusque dans la matrice où la MTS est clivée par la MPP (mitochondrial processing peptidase) et où ces protéines vont terminer leur repliement grâce à l'action de chaperonnes telles que les HSPs (heat shock proteins) 10, 60 ou 70 (Wiedemann and Pfanner, 2017).

2) Fonctions physiologiques des mitochondries

Fonctionnellement, les mitochondries sont des acteurs clés de l'homéostasie cellulaire, en fournissant la majorité (environ 90%) de l'**énergie de la cellule**, sous forme de molécules d'adénine triphosphate (ATP), produits de la **phosphorylation oxydative (OXPHOS)** réalisée par les protéines de la CRM (*Figure 15*). En amont de l'OXPHOS, la **β -oxydation des acides gras (OAG)** est un processus séquentiel de dégradation des acides gras (AG) importés dans la matrice (grâce à la navette carnitine pour les AG à longue chaîne carbonée), générant des coenzymes réduites (NADH et FADH₂) et se terminant avec la production d'acétyl-CoA qui va servir dans le **cycle de Krebs** (cycle de l'acide citrique). L'acétyl-CoA peut également être généré, en aval de la glycolyse, à partir du pyruvate par la pyruvate déshydrogénase (PDH). Le pyruvate peut également être généré à partir du lactate, ce qui semble particulièrement pertinent pour les neurones car le lactate produit par les astrocytes, dont le métabolisme est glycolytique, est transporté dans les neurones (Bliss et al., 2004). Le cycle de Krebs permet l'oxydation des nutriments et va aussi générer des coenzymes réduites NADH et FADH₂ qui sont des donneurs d'électrons à la CRM constituée de 5 complexes enzymatiques multiprotéiques : le complexe I (NADH déshydrogénase), II (succinate déshydrogénase), III (cytochrome C oxydo-réductase),

IV (cytochrome C oxydase) et V (ATP synthase), et de deux porteurs d'électrons mobiles, l'ubiquinone/Coenzyme Q (CoQ) et le cytochrome C (Cyt-C) présents dans l'EIM. Les électrons donnés par la NADH et FADH₂ au complexe I et au complexe II respectivement, sont transportés le long de la chaîne (du complexe I au IV, en passant par le CoQ et le Cyt-C) jusqu'à l'accepteur final, l'O₂ qui est réduit en H₂O. Lors des transferts d'électrons de complexe en complexe, des protons sont pompés de la matrice à l'EIM au niveau des complexes I, III et IV, ce qui génère un différentiel de concentration en protons entre les deux côtés de la MMI, appelé potentiel de membrane mitochondriale ($\Delta\Psi_{mit}$). Ce gradient de protons fournit l'énergie nécessaire à l'activité de l'ATP synthase (complexe V) produisant l'ATP dans la matrice à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Cependant, l'efficacité de la synthèse d'ATP n'est de 100% qu'en théorie. Des protons peuvent fuir dans la matrice, ce qui engendre une diminution du $\Delta\Psi_{mit}$. Des électrons peuvent également fuir la chaîne de transport et réagir avec des molécules d'O₂ pour former des ROS mitochondriaux (ROSmit), tel que le radical superoxyde O₂⁻ de courte durée de vie et rapidement converti dans la matrice en peroxyde d'hydrogène H₂O₂ par la manganèse-dépendant superoxyde dismutase (Mn-SOD). Cet H₂O₂ peut être détecté et converti en H₂O et O₂ dans la matrice par la catalase (pour les mitochondries hépatiques et cardiaques) et deux systèmes enzymatiques dépendant du NADPH, le système thiorédoxine / thiorédoxine réductase (trx/trxR) et le système glutathion peroxydase / glutathion réductase (GP/GR). Il existe également une seconde ligne de défense non-enzymatique, faite de molécules antioxydantes, comme les vitamines C et E, certains polyphénols naturels (resvératrol par exemple) et le glutathion (GSH). Les ROSmit sont également produits en condition physiologique mais leur concentration est maintenue à des niveaux faibles par les différents mécanismes antioxydants. Des niveaux de ROSmit élevés cependant, causent un stress oxydatif (SO) caractérisé par une oxydation directe des macromolécules (protéines, lipides, ADNmit).

Les mitochondries sont aussi impliquées dans l'**homéostasie calcique**. En effet, elles sont capables d'accumuler des ions calcium Ca²⁺ à travers VDAC de la MME et le complexe MCU (mitochondrial calcium uniporter) localisé à la MMI. Le Ca²⁺ mitochondrial stimule l'activité de la PDH et deux enzymes du cycle de Krebs (isocitrate déshydrogénase et α -cétoglutarate déshydrogénase) (Denton, 2009) et participe ainsi à l'activité de la CRM (Glancy et al., 2013). Cependant, une surcharge de Ca²⁺ dans la mitochondrie provoque une ouverture persistante du mPTP (mitochondrial permeability transition pore). La composition moléculaire exacte du complexe mPTP fait encore débat, mais la participation des protéines VDAC (MME), ANT (MMI) et Cyclophiline D (Cyp-D) au niveau de la matrice, font consensus. Il est établi qu'en cas d'ouverture pathologique et prolongée du mPTP, il y a une perte du $\Delta\Psi_{mit}$, un arrêt de la production d'ATP, un gonflement des mitochondries (Kroemer et al., 2007), le relargage accru de Ca²⁺ et de ROSmit depuis la mitochondrie et même le relargage de facteurs apoptotiques (Cyt-C par exemple) de l'EIM provoquant la mort cellulaire par **apoptose** (Green and Kroemer, 2004). Ainsi le relargage du Cyt-C peut participer à la formation de l'apoptosome, constitué de l'interaction du Cyt-C avec des oligomères d'APAF-1 (apoptotic peptidase activating factor 1). L'apoptosome joue donc un rôle de plateforme de recrutement de la procaspase-9 qui s'auto-active, puis active des procaspases effectrices de l'apoptose (procaspase-3 et procaspase-7). D'autres facteurs apoptotiques sont relargués par la mitochondrie, comme l'endonucléase G et l'AIF (apoptosis inducing factor) qui participent à la dégradation de l'ADNg (Wang and Youle, 2009).

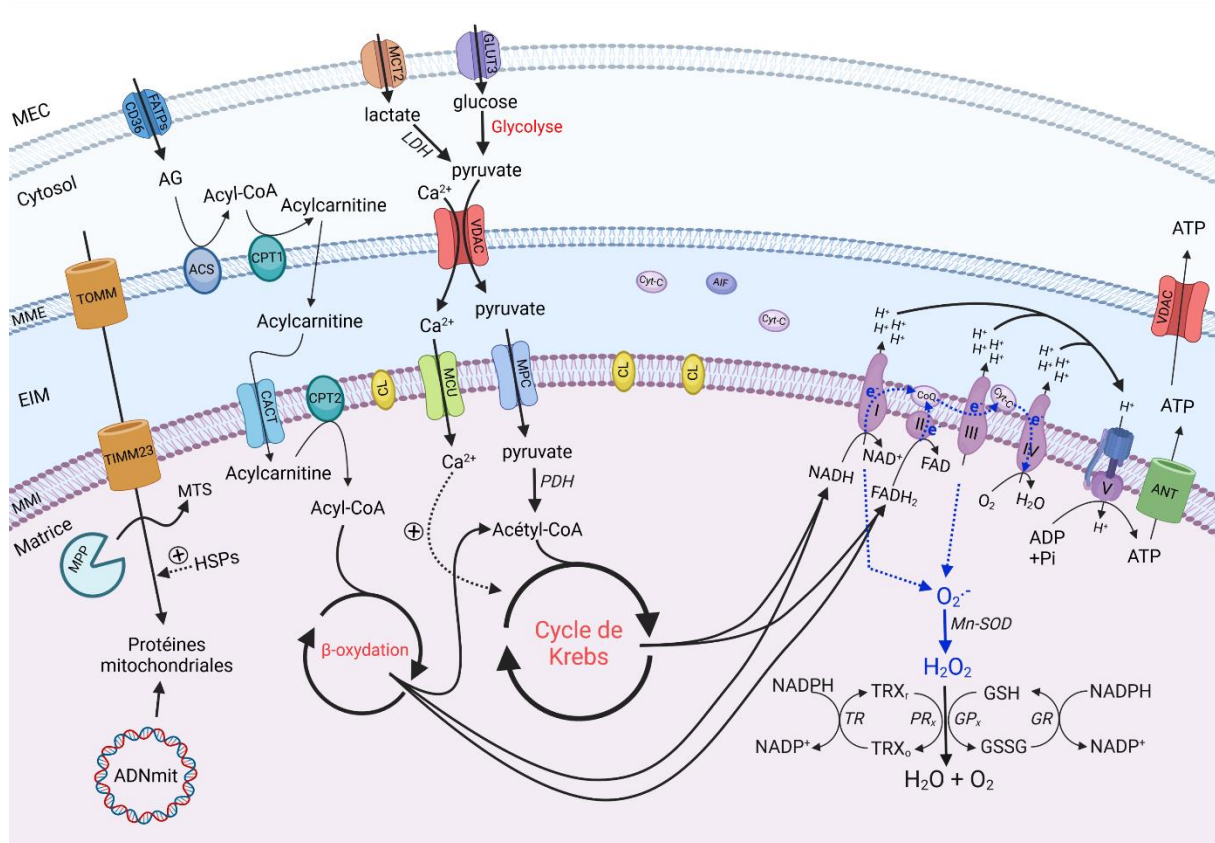


Figure 15 : Les principales fonctions physiologiques des mitochondries. Figure réalisée sur BioRender.com. TOMM : translocase of outer mitochondrial membrane, TIMM : translocase of inner mitochondrial membrane 23, MPP : mitochondrial processing peptidase, MTS : mitochondrial targeting sequence, HSP : heat-shock protein, ADNmit : ADN mitochondrial, FATPs : fatty acid transport proteins, AG : acide gras, ACS : Acyl-CoA synthase, CPT1/2 : carnitine O-palmitoyltransférase 1/2, CACT : carnitine-acylcarnitine translocase, CL : cardiolipine, MCT2 : monocarboxylate transporter 2, LDH : lactate déshydrogénase, GLUT3 : glucose transporter 3, VDAC : Voltage Dependent Anion Channel, MCU : mitochondrial calcium uniporter, MPC : mitochondrial pyruvate carrier, PDH : pyruvate déshydrogénase, Cyt-C : cytochrome C, AIF : apoptosis inducing factor, CoQ : Coenzyme Q, ANT : adénine nucléotide translocase, Mn-SOD : manganèse-dépendant superoxyde dismutase, TRX_r : thiorédoxine réduite, PR_x : thiorédoxine peroxydase, TRX_o : thiorédoxine oxydée, TR : thiorédoxineréductase, GSH : glutathion (réduit), GP_x : glutathion peroxydase, GSSG : glutathion (oxydée), GR : glutathion réductase. MEC : milieu extracellulaire.

Les mitochondries sont des organites dynamiques, elles peuvent augmenter leur nombre par fission et le réduire par fusion. Physiologiquement, les mitochondries réalisent des événements de fission et de fusion continuellement pour maintenir un « pool » de mitochondries saines et éliminer des parties de mitochondries dysfonctionnelles lors du processus mitophagique (*décrit plus loin*), et une bonne distribution des organites lors de la division cellulaire. La fusion des mitochondries est orchestrée par trois GTPases : les mitofusines 1 et 2 (MFN1/2) pour la fusion des MME et OPA1 (optic atrophy type 1) pour la fusion des MMI. La fission est orchestrée par la GTPase DRP1 (dynamine-related protein 1), recruté à la MME par MFF (mitochondrial fission factor), Fis1 (mitochondrial fission protein 1) ou MiD49/51 (mitochondrial dynamics protein 49/51). Les DRP1 recrutés vont se distribuer autour de la mitochondrie en une structure d'anneau et initient la constriction de la mitochondrie à ce niveau, qui finit par se scinder en deux.

Enfin, les mitochondries peuvent aussi participer à la **thermogenèse**, au **cycle de l'urée**, à la **biosynthèse de l'hème et des hormones stéroïdes**, ainsi qu'au **métabolisme des acides aminés** (ces différentes fonctions n'ont pas été abordées dans ma thèse).

B) Dysfonctions mitochondriales dans le contexte de la MA

Le cerveau humain contient près de 100 milliards de neurones, des cellules qui ont besoin de beaucoup d'énergie ainsi que d'un « pool » de mitochondries saines pour fonctionner correctement. C'est pour cela que l'homéostasie, l'élimination des mitochondries dysfonctionnelles et la genèse de nouvelles mitochondries dans les neurones sont des mécanismes fondamentaux pour le maintien de la viabilité des différentes cellules du cerveau. L'altération de l'un de ces processus conduit au développement de plusieurs MND comme la MA. Il y a un débat concernant la place des dysfonctions mitochondriales dans la MA. Sont-ils la conséquence d'autres changements pathologiques, comme le développement de la pathologie amyloïde ? Ou bien, comme postulé en 2004 par « l'hypothèse de la cascade mitochondriale (primaire) », ces dysfonctions sont en amont d'autres perturbations, comme la génération de l'A β (Swerdlow and Khan, 2004). De nombreux paramètres liés aux fonctions des mitochondries déclinent au cours du vieillissement et sont encore plus compromis chez les patients atteints de la MA comparés à des personnes saines du même âge. De plus, les études *in vitro* et sur des modèles animaux ont permis d'étoffer nos connaissances sur les nombreuses dysfonctions mitochondriales présentes dans la MA. Parmi les altérations pathologiques les plus marquées (*Figure 16*), on retrouve :

-Baisse de la biogenèse mitochondriale. La biogenèse mitochondriale a lieu par fission et ajout de nouveau matériel aux mitochondries déjà présentes dans la cellule. Le facteur de transcription maître de la biogenèse est PGC-1 α (peroxisome-proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α). Dans des hippocampes de patients atteints de la MA, les niveaux d'ARN messager (ARNm) et de protéines de PGC-1 α sont diminués, ainsi que sa translocation nucléaire (Qin et al., 2009; Sheng et al., 2012). Différents facteurs de transcription de la biogenèse sous le contrôle de PGC-1 α ont aussi leurs niveaux réduits (Sheng et al., 2012).

-Perturbation de la balance fission/fusion. Dans la MA, cet équilibre est perturbé en faveur de la fission, entraînant l'apparition d'un phénotype de fragmentation des mitochondries et une perturbation de leur distribution (mitochondries moins présentes dans les axones et les terminaisons) (Wang et al., 2008a; Wang et al., 2009). Dans la MA, les acteurs connus de la fusion (MFN1, MFN2 et OPA1) ont des niveaux réduits (Manczak et al., 2011; Wang et al., 2009) et ceux de la fission, DRP1 et un de ses récepteurs mitochondriaux Fis1 ont des niveaux augmentés (Wang et al., 2009; Wang et al., 2008b). De plus, malgré l'existence d'études contradictoires quant à la variation des niveaux protéiques de DRP1, concluant parfois à une diminution de l'expression de DRP1 (Wang et al., 2009) et parfois à son augmentation (Manczak et al., 2011), plusieurs groupes ont rapporté une augmentation de plusieurs MPT de DRP1 (S-nitrosylation, pSer616 et O-linked β -N-acetylglucosamine (O-GlcNAc)) qui augmentent son recrutement à la mitochondrie et la fission mitochondriale (Cho et al., 2009; Park et al., 2021; Wang et al., 2009). En plus d'une interaction entre pTau et DRP1 (Manczak and Reddy, 2012), l'interaction entre la protéine DRP1 avec l'A β monomériques et oligomériques (A β o) semble augmenter dans les cerveaux de patients Alzheimer (Manczak et al., 2011), conduisant à une exacerbation du processus de fission. Enfin, l'identification d'un SNP dans le gène codant pour MFN2 chez 165 patients Alzheimer Coréens suggère bien qu'une perturbation du processus de la fusion mitochondriale serait impliquée dans la MA (Kim et al., 2017).

-Baisse du transport axonal des mitochondries. Le transport antérograde (du soma aux extrémités) permet au neurone d'alimenter l'axone et les extrémités en mitochondries jeunes et saines, tandis que le transport rétrograde (des extrémités au soma) permet de rapatrier les mitochondries âgées et/ou endommagées dans le soma pour leur dégradation par le lysosome (voir chapitre mitophagie). L'A β , comme Tau et pTau, régulent négativement le transport axonal et donc le transport de mitochondries le long de l'axone, ce qui résulte en une diminution de la densité en mitochondries dans l'axone et les dendrites et en leur accumulation dans les synapses et le soma (Du et al., 2010; Dubey et al., 2008; Rui et al., 2006; Stokin and Goldstein, 2006). Les mécanismes moléculaires impliqués dans l'altération du transport mitochondrial restent encore peu décrits dans le contexte de la MA. Toutefois, les cerveaux de

patients Alzheimer montrent une baisse des niveaux de la protéine DISC1 (Disrupted-in-schizophrenia-1), impliquée dans le transport rétrograde des mitochondries (Wang et al., 2019). De plus, l'expression de PS1 avec la mutation familiale M146V conduit à une augmentation de la phosphorylation de la KLC (kinesin-I light chain) par la GSK3 β , provoquant la perte de l'association de la Kinésine-I avec les organelles à transporter, et donc une réduction du transport antérograde (Pigino et al., 2003). Enfin, dans des neurones hippocampiques l'expression d'une forme de Tau clivée par la caspase 3 provoque une réduction des niveaux de TRAK2 (trafficking kinesin protein 2), un adaptateur mitochondrial des moteurs de transport (Quintanilla et al., 2020).

-Baisse de l'activité de la CRM et des enzymes du cycle de Krebs. Dans les cerveaux de patients atteints de la MA, il y a une diminution de l'activité de certaines enzymes impliquées dans la CRM (complexe I et IV) (Adav et al., 2019; Gibson and Shi, 2010; Maurer et al., 2000; Wojsiat et al., 2015), et une expression significativement réduite d'une sous-unité de l'ATP synthase, l'OSCP (oligomycin sensitivity conferring protein). *In vitro*, l'A β interagit physiquement avec l'OSCP, provoquant une déstabilisation du complexe V et une baisse de la production d'ATP (Beck et al., 2016). En amont de l'activité de la CRM, d'autres études ont reporté une altération de l'activité d'enzymes de la matrice mitochondriale comme la PDH ainsi que de l'isocitrate déshydrogénase (IDH) et l' α -cétoglutarate déshydrogénase (α KGDH) dans le cerveau de patients Alzheimer (Bubber et al., 2005). Plus récemment, une étude a montré une diminution des niveaux de métabolites du cycle de Krebs et de l'OXPHOS et une diminution de l'expression de gènes d'enzymes impliquées dans l'OAG et le cycle de Krebs (IDH1) dans des cellules progénitrices neurales ou astrocytes dérivés de cellules iPSC (induced pluripotent stem cells) de patients Alzheimer sporadiques (Ryu et al., 2021).

-Augmentation de la production de ROSmit. Dans la MA, on observe une augmentation de l'oxydation des lipides, protéines, ADN et ARN, tant au niveau du CNS (central nervous system) (Nunomura et al., 1999; Simpson et al., 2010; Tayler et al., 2010; Wang et al., 2005) que dans les tissus périphériques (Cecchi et al., 2002; Moreira et al., 2007). Dans le plasma de patients avec une MA modérée, il y a une augmentation de la concentration de glutathion oxydé (GSSG) non accompagnée d'une baisse de la forme réduite (GSH), signe d'un SO, et une baisse de la concentration d'un antioxydant non-enzymatique (vitamine E) signe d'une baisse des capacités antioxydantes chez les malades (Baldeiras et al., 2008). D'ailleurs, la vitamine E est capable de bloquer le SO provoqué par l'A β ₁₋₄₂ dans des neurones hippocampiques embryonnaires de rat (Yatin et al., 2000). De plus, les niveaux de glutathion (GSH) diminuent dans les astrocytes et neurones hippocampiques de cultures mixtes neurones/astrocytes suite à un traitement à l'A β ₁₋₄₂ et A β ₂₅₋₃₅, causant une mort neuronale (Abramov et al., 2003), et les niveaux de GSH diminuent aussi dans les hippocampes des patients MCI et atteints de la MA (Shukla et al., 2021).

-Augmentation de l'oxydation et des mutations de l'ADNmit. Le génome mitochondrial est particulièrement sensible aux ROSmit, d'une part, du fait de la proximité physique entre la production de ces ROSmit et l'ADNmit et d'autre part car l'ADNmit est moins bien protégé que l'ADNg (absence d'histones ou de protéines liées à l'ADNmit et systèmes de réparations de l'ADN différents de ceux de l'ADNg par exemple). En effet, une augmentation de dégâts causés par les ROSmit de l'ADNmit (niveaux d'oxydation de l'ADNmit évalués par les niveaux de 8-hydroxyguanine (8-OHdG)) a été observé dans les cerveaux de patients atteints de la MA (de la Monte et al., 2000). Cette oxydation cause des mutations dans l'ADNmit. De plus, plusieurs marqueurs d'oxydation de l'ADNmit (et dans une moindre mesure de l'ADNg) sont augmentés dans la MA, et ce, même à des stades précoces voir précliniques (Lovell et al., 2011; Wang et al., 2006). De plus, un des mécanismes de contrôle-qualité de l'ADNmit, la réparation par excision de base (REB), capable de retirer les bases oxydées voit l'activité de l'une de ses enzymes, l'oxoguanine glycosylase 1 (OGG1), est diminuée dans les cerveaux de patients MCI et Alzheimer à un stade avancé (Shao et al., 2008).

-Défaut des MAMs (mitochondria-associated membranes). 5 à 20% de la surface du réseau mitochondrial est accolé à une distance comprise entre 10 à 30nm de la membrane du RE (Csordás et al., 2006). Ces domaines d'interaction physique et fonctionnelle entre les deux organites participent à l'homéostasie calcique, le métabolisme, le transport de protéines, la production de lipides

mitochondriaux, la synthèse de phospholipides, la balance fission/fusion, la mitophagie, l'apoptose et le stress du RE (van Vliet and Agostinis, 2018; Veeresh et al., 2019; Walter and Hajnóczky, 2005). Plusieurs acteurs de la MA ont été rapportés comme perturbant la structure des MAMs ainsi que leur fonctionnement dans la MA (Eysert et al., 2020) (revue en Annexe 4 à laquelle j'ai participé). Dans des cellules de neuroblastomes murins (N2a), l'expression d'APOE4 provoque une augmentation des niveaux de plusieurs protéines d'ancrages des MAMs (VDAC1, IP3R, BAP31, Fis1 et MFN2), ainsi qu'une augmentation des niveaux de ROSmit et de $[Ca^{2+}]_{mit}$ (Orr et al., 2019). Ce résultat suggère une augmentation du nombre et des fonctions des MAMs causée par l'expression d'APOE4. Cette conclusion a été confirmée dans des fibroblastes de patients et des neurones hippocampiques de souris cultivés avec des milieux conditionnés (MC) d'astrocytes issus de souris APOE ϵ 3 ou APOE ϵ 4 (Tambini et al., 2016). Avec le MC « APOE ϵ 4 », il y a une augmentation de deux fonctions des MAMs, la synthèse de phospholipides et d'oléate de cholestérol, augmentation abolie en cas de délétion génétique de MFN2. PS1 et PS2 sont toutes deux présentes au niveau des MAMs (Area-Gomez et al., 2009). L'interaction de PS2 avec MFN2 est augmentée dans le cas de mutations PS2 familiales (T122R et N141I) (Filadi et al., 2016), induisant ainsi une augmentation de l'influx mitochondrial de Ca^{2+} relargué par le RE. L'A β et le C99 sont également présents dans les MAMs, ce qui est une conséquence de la présence d'APP au niveau de la mitochondrie (Devi et al., 2006), de la présence de PS1 et PS2 aux MAMs (Area-Gomez et al., 2009) et de la détection d'une activité β - et γ -sécrétase dans les MAMs (Del Prete et al., 2017). La présence de ces catabolites de l'APP est associée à une augmentation du nombre de contacts RE-mitochondries dans des cellules SH-SY5Y surexprimant l'APPswe (Del Prete et al., 2017) et dans des fibroblastes de patients sporadiques ou avec une mutation familiale, ainsi que dans des MEF (mouse embryonic fibroblasts) de souris avec une déplétion de PS1 ou PS2 ou des deux (Area-Gomez et al., 2012). Enfin, l'expression de Tau (P301L) chez des souris conduit à l'augmentation de la présence de pTau à la surface du RE rugueux (également observée dans des cerveaux de patients) et à l'augmentation du nombre de MAMs (Perreault et al., 2009).

-Surcharge du stockage de Ca^{2+} dans la mitochondrie ($[Ca^{2+}]_{mit}$). Cette surcharge semble liée à l'augmentation des contacts de la mitochondrie avec le RE, ce qui provoque une augmentation du flux de Ca^{2+} du RE vers la mitochondrie, causant par la suite une ouverture persistante du mPTP et donc une augmentation de Ca^{2+} cytosolique (Pérez et al., 2018). *In vitro*, l'application de l'A β induit une importante entrée de Ca^{2+} dans la cellule et une surcharge de $[Ca^{2+}]_{mit}$ et, consécutivement, provoque l'ouverture du mPTP, le relargage de Cyt-C et l'apoptose (Sanz-Blasco et al., 2008). D'un point de vue mécanistique, il a été décrit *in vitro* que même des quantités nanomolaires de l'A β augmentent les quantités d'IP3R (canal calcique du RE) et de VDAC, ce qui provoque une augmentation des MAMs et de l'influx de Ca^{2+} dans la mitochondrie (Hedskog et al., 2013). Un autre article a, en plus, rapporté qu'un traitement avec de l'A β et du NMDA provoque une augmentation de $[Ca^{2+}]_{cyt}$ dû à un efflux de Ca^{2+} du RE par l'IP3R et sa capture dans la mitochondrie par le MCU (Ferreira et al., 2015). En complément d'un influx exacerbé, la surcharge en Ca^{2+} mitochondrial dans la MA semble également dû à une diminution de l'efflux de Ca^{2+} de la mitochondrie (Jadiya et al., 2019). La principale voie de sortie du Ca^{2+} mitochondrial est par l'échangeur $Na^+/Ca^{2+}/Li^+$ (NCLX), dont le niveau d'expression est progressivement réduit dans les souris 3xTgAD et est diminué dans les cerveaux de patients Alzheimer (Jadiya et al., 2019). De plus, la restauration de l'expression de NCLX dans des cellules N2a exprimant l'APPswe permet d'augmenter l'efflux de Ca^{2+} mitochondrial et de corriger la surcharge de son stockage dans la mitochondrie (Jadiya et al., 2019). Une étude *in vivo* a également décrit que la surcharge en $[Ca^{2+}]_{mit}$ médiée par le MCU est consécutive à l'apparition des plaques amyloïdes (Calvo-Rodriguez et al., 2020).

-Augmentation de l'activation du mPTP. Dans des fibroblastes de patients sporadiques, il a été rapporté une activation persistante du mPTP, provoquant une élévation des ROSmit et une dérégulation de l'homéostasie calcique (Pérez et al., 2018). Une augmentation de la formation de mPTP a également été suggérée chez des souris surexprimant l'APP humain (hAPP) (Du et al., 2010). L'A β a été décrit comme interagissant directement avec Cyp-D, augmentant ainsi l'activation du mPTP, et il a été observé que les niveaux de complexes A β -Cyp-D sont fortement augmentés dans les cerveaux des malades Alzheimer (Du et al., 2008; Du et al., 2011). Par ailleurs, la déplétion de la Cyp-D chez des souris

APPswe/Ind très âgées (22 à 24 mois) a permis d'améliorer les fonctions mitochondriales, les capacités d'apprentissage et la mémoire spatiale des souris (Du et al., 2011). Dans les cerveaux humains le fragment neurotoxique de Tau (NH_2Tau) interagit avec l'ANT et les complexes ANT-Cyp-D, favorisant la formation de complexes contenant $\text{A}\beta$ -ANT-Cyp-D (Amadoro et al., 2012) et la déplétion génétique de Tau chez la souris est bénéfique, notamment grâce à une diminution des niveaux de Cyp-D et une inhibition de la formation de mPTP (Jara et al., 2018). D'ailleurs, l'inhibition de la Cyp-D permet de réduire la fragmentation mitochondriale et la chute du $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ dans des neurones corticaux murins exprimant une forme toxique de Tau clivée par la caspase 3 (Quintanilla et al., 2009).

-Défauts d'import de protéines mitochondriales. L'accumulation de l'APP (orientée avec son extrémité N-terminale dans la mitochondrie et son extrémité C-terminale à l'extérieur de la mitochondrie) dans les complexes TOMM/TIMM cause un blocage de l'import mitochondrial de plusieurs protéines codées par l'ADNg, dont certaines sont cruciales pour la production d'ATP, comme les sous-unités IV et Vb du complexe IV de la CRM (Devi et al., 2006). De plus, l' $\text{A}\beta_{1-42}$ est également reconnu par la protéine TOMM22 (Hu et al., 2018) et est internalisé à travers la machinerie TOMM/TIMM pour se retrouver localisé au niveau des crêtes mitochondriales (Hansson Petersen et al., 2008). Mais il a également été rapporté que les traitements exogènes avec de l' $\text{A}\beta_{1-42}$ et $\text{A}\beta_{25-35}$ causent un blocage de l'import de protéines mitochondriales codées par l'ADNg (TOMM20 et HSP70 par exemple) *in vitro* (Sirk et al., 2007). Un tel blocage chronique de l'import est associé à une morphologie mitochondriale plus fragmentée, une diminution de $\Delta\Psi_{\text{mit}}$ et une augmentation des niveaux de ROSmit.

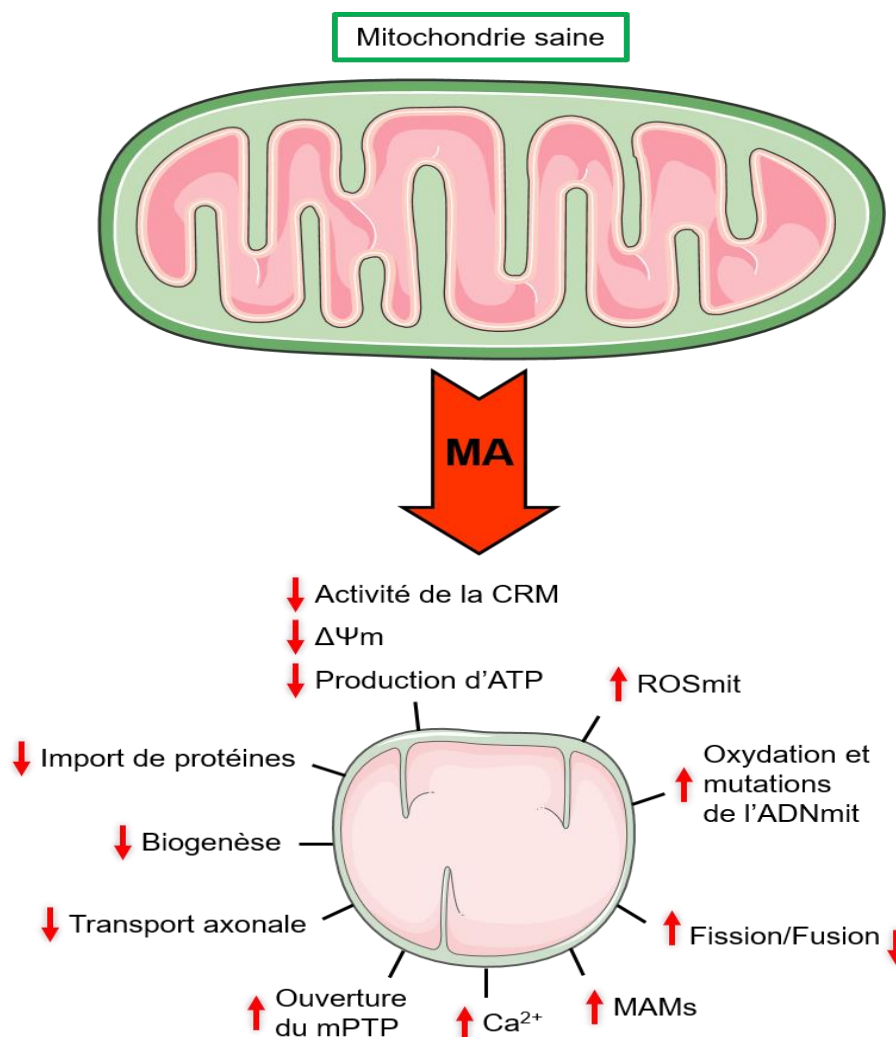


Figure 16 : Les principales dysfonctions mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer (MA). Adapté de (Cenini and Voos, 2019).

La mitophagie : description physiologique et dysfonctions dans la MA

A) Rôle physiologique de la mitophagie

1) Description du processus et fonctions

La mitophagie est un processus cellulaire de **contrôle qualité des mitochondries** impliquant l'**adressage** et la **dégradation de mitochondries endommagées, âgées ou superflues**. La mitophagie est un processus catabolique, un type de macroautophagie sélective des mitochondries se déroulant en plusieurs étapes séquentielles (*Figure 17* et *Figure 23.A*). Il y a d'abord la formation d'une double membrane formant le phagophore, puis la reconnaissance de la mitochondrie à dégrader, soit par des récepteurs présents dans les membranes des mitochondries qui se lient aux protéines LC3 (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3)-II (*dont les mécanismes de sa formation seront décrits plus loin*) ancrées dans le phagophore, soit par des adaptateurs cytosoliques liant à la fois le signal de dégradation présent à la surface de la mitochondrie et à la fois LC3-II. Le phagophore ainsi recruté va s'allonger autour de la mitochondrie et va finir par l'isoler du reste du cytoplasme dans une vésicule appelée mitophagosome. Le mitophagosome va fusionner avec le lysosome pour former le mitolysosome, dans lequel les enzymes lysosomales vont dégrader la mitochondrie en acides aminés et acides gras réutilisables par la cellule.

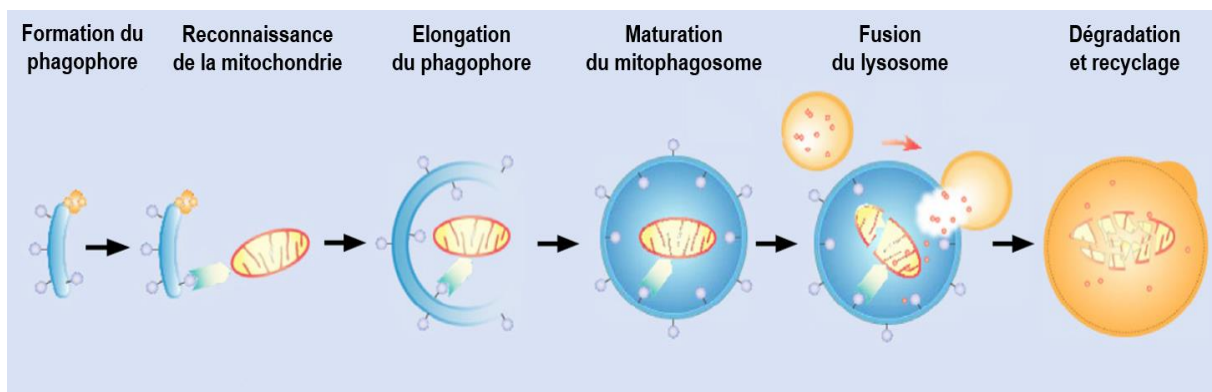


Figure 17 : Les étapes de la mitophagie. Adapté de (Lou et al., 2020).

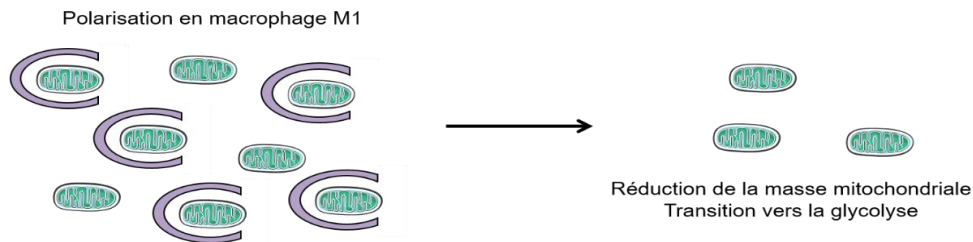
Le processus de la mitophagie peut remplir trois grandes fonctions physiologiques (*Figure 18*) :

-La mitophagie programmée. Elle a lieu lors du développement, pour l'élimination de l'ADNmit paternel après la fertilisation de l'ovocyte par exemple. Elle a aussi lieu lors de la différenciation cellulaire, par exemple pour l'élimination des mitochondries lors de la maturation des réticulocytes en globules rouges, ou pour faire basculer le métabolisme de la phosphorylation oxydative vers la glycolyse lors de la polarisation des macrophages en macrophages pro-inflammatoires de type M1 (Esteban-Martinez et al., 2017). Il est à noter que lors de cette mitophagie programmée, il s'agit bien de dégrader des mitochondries saines, mais surnuméraires pour le destin ou la fonction de la cellule.

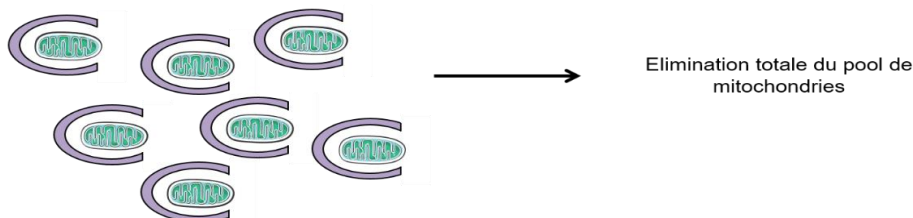
-La mitophagie basale, active en l'absence de stress mais à différentes intensités selon les tissus, va éliminer les mitochondries âgées dans le cadre du renouvellement des mitochondries. Cela permet aux cellules de maintenir un « pool » de mitochondries assurant le maintien de l'homéostasie cellulaire.

-La mitophagie induite par un stress. Certains stress sont connus pour augmenter, en réaction, l'activité mitophagique comme, par exemple, le stress hypoxique pour réduire la quantité de mitochondrie et favoriser la glycolyse (Zhang et al., 2008). Enfin, la présence de sous-domaines voire de mitochondries entières endommagées présentant une perte de $\Delta\Psi_{mit}$ va aussi déclencher la détection de cette altération, puis le marquage de la mitochondrie par un signal de dégradation (voir le paragraphe sur la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante) adressant cette mitochondrie à la mitophagie, ce qui permet d'éliminer spécifiquement les mitochondries dysfonctionnelles et préserver un « pool » d'organites sains.

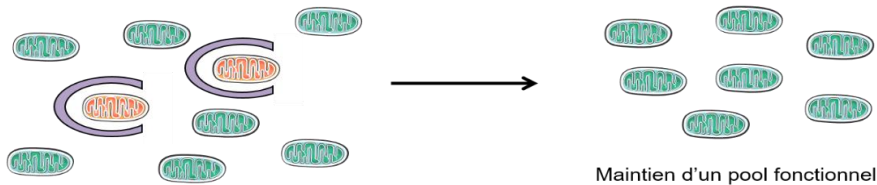
1. La mitophagie programmée



Elimination de l'ADNmit paternel après fertilisation
Maturation des globules rouges

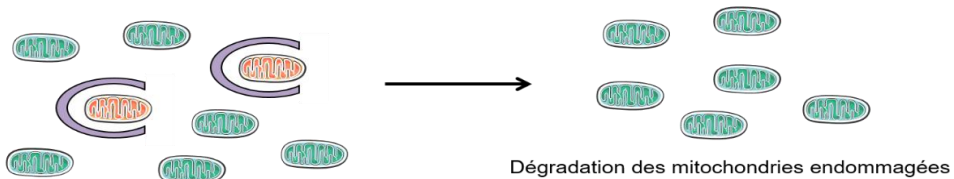


2. La mitophagie basale

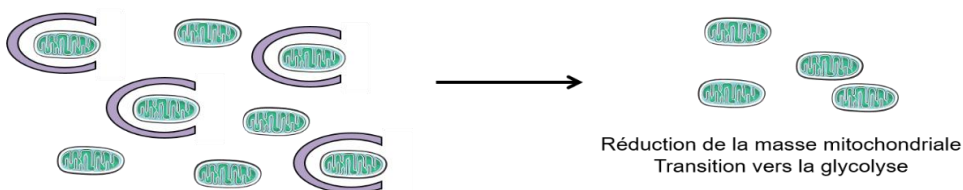


3. La mitophagie induite par un stress

Diminution du potentiel de membrane



Hypoxie



Mitochondrie saine

Mitochondrie âgée ou endommagée

Phagophore

Figure 18 : Les trois grandes fonctions physiologiques de la mitophagie. Adapté de (Palikaras et al., 2018).

Si la mitophagie a différentes fonctions et différents stimuli déclencheurs, elle aura toujours en commun la reconnaissance de la mitochondrie, sa séquestration dans un mitophagosome puis sa dégradation lysosomale. Cependant, toutes les mitophagies ne sont pas caractérisées par la participation des mêmes acteurs moléculaires, ce qui conduit à une description de plusieurs types de mitophagies selon la cascade moléculaire impliquée.

2) Les différents types de mitophagies et leur description moléculaire

a) *La formation du phagophore*

Cette étape de la formation du phagophore est commune aux différents types de mitophagies détaillées ci-après, et avec tous les types de macroautophagies. Cette étape implique la participation d'un nombre important de protéines et de complexes moléculaires, dont les plus importants seront évoqués ci-après (*Figure 19*). Suite à un stimulus d'activation de la macroautophagie, le complexe mTORC1 (mTOR complex 1) est inhibé (en cas de carence en nutriments par exemple) et/ou le complexe AMPK est activé (en cas de stress énergétique par exemple), ce qui inhibe également mTORC1. Ceci résulte en la levée de l'inhibition de la kinase ULK1 (Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase 1) et son activation au site de formation du phagophore au niveau du RE. ULK1 va y phospho-activer plusieurs protéines impliquées dans l'exécution du processus, dont ses propres partenaires membres du « complexe d'initiation ULK1 » (FIP200, ATG101 et ATG13), ainsi que des membres du complexe PI3kinase de classe I (ATG14L, VSP34 et Beclin-1 (Bcl-1)). Ce complexe PI3kinase de classe I participe à la génération de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) au niveau de la membrane naissante du phagophore. L'accumulation de PIP3 à la membrane du phagophore forme une plateforme de recrutement d'autres protéines et complexes. Ainsi, le complexe ATG16L1-ATG5-ATG12 est recruté au phagophore via WIPI2 (WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 2) qui lie à la fois le PI3P et ATG16L1. La protéine LC3 est activée par le complexe ATG4-ATG7-ATG3 (clivage du pro-LC3 en LC3-I par ATG4) et ce LC3-I va être conjugué avec une molécule de phosphatidyléthanolamine en C-terminal par ATG3, réaction stimulée par le complexe ATG16L1-ATG5-ATG12, pour former du LC3-II. Ces LC3-II vont être ancrés dans la double membrane du phagophore et vont ensuite pouvoir être liés par des adaptateurs ou récepteurs mitophagiques pour recruter le phagophore à la mitochondrie à dégrader.

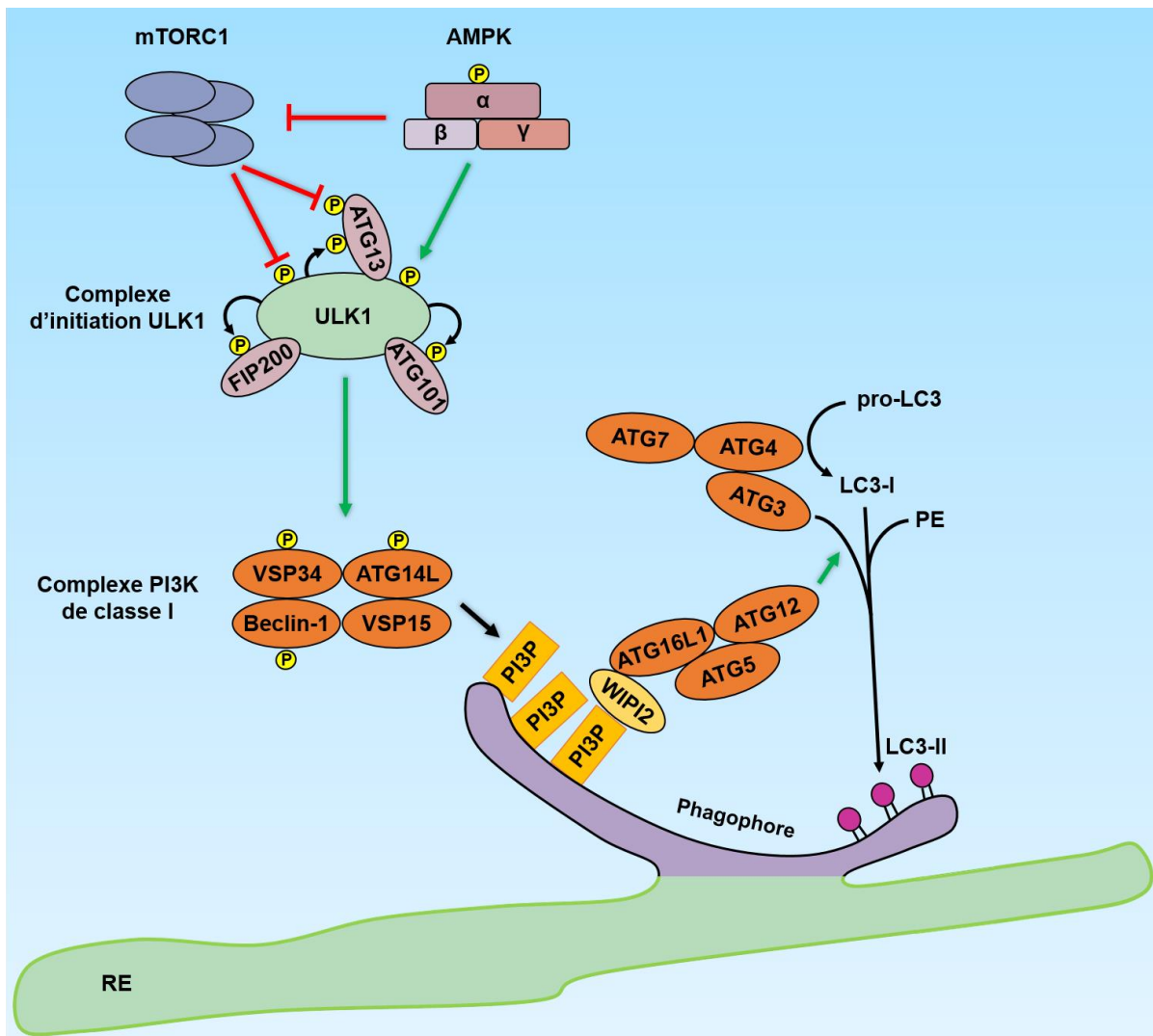


Figure 19 : Aperçu des complexes impliqués dans la formation du phagosome.

C'est à l'étape suivante, celle du recrutement de ce phagosome à la mitochondrie à dégrader, que le processus peut être divisé en deux types de mitophagies, selon les acteurs moléculaires y participant, et, plus précisément, selon quel acteur va lier le LC3-II du phagosome. Le premier type de mitophagie que je vais décrire est dite « **canonique** » (Figure 20), dépendante de l'activation des protéines PINK1 (PTEN-induced kinase 1) et Parkine et de l'ubiquitination de la mitochondrie, et le deuxième type est la mitophagie dite « **non-canonique** », dépendante de récepteurs mitophagiques mais indépendante de PINK1/Parkine et de l'ubiquitination (Figure 21).

b) Mitophagie PINK1/Parkine-dépendante

En condition basale, la **kinase cytosolique PINK1**, du fait de sa séquence MTS est continuellement importée dans la mitochondrie saine à travers les complexes de translocation TOMM et TIMM23 et va subir un clivage par la protéase de la matrice de la mitochondrie MPP pour retirer cette séquence MTS (Greene et al., 2012) puis par la protéase de la MMI PARL (PINK1/PGAM5-associated rhomboid-like protease). PARL va cliver PINK1 dans son domaine traversant la MMI, entre les acides aminés Ala103 et Phe104 (Deas et al., 2011), ce qui va générer une PINK1 N-tronquée de 52kDa (PINK1₅₂) alors relarguée dans le cytoplasme. Cette PINK1 tronquée par PARL possède désormais un résidu phénylalanine en N-terminal constituant un signal de dégradation de type 2 dans la « N-end rule

pathway », reconnue par les E3 Ubiquitin ligases UBR (Ubiquitin Protein Ligase E3 Component N-Recognin) 1, 2 et 5 qui vont adresser PINK1₅₂ au protéasome pour y être dégradée (Yamano and Youle, 2013). Lorsqu'une mitochondrie est altérée, par exemple à cause de dysfonctions de sa CRM, d'un stress mutagène ou protéotoxique, entraînant une perte de $\Delta\Psi_{mit}$, PINK1 totale (non clivée) se trouve alors stabilisée à la MME, par interaction avec le complexe TOMM (composé de TOMM20, TOMM22, TOMM40, TOMM70 (Lazarou et al., 2012; Okatsu et al., 2013), et en se liant à TOMM7 (Hasson et al., 2013). Un autre mécanisme participant à la stabilisation de PINK1 totale est dû à l'interaction entre PHB2 (prohibitin-2) et PARL, entraînant la baisse de l'activité protéasique de PARL (Yan et al., 2020). En condition basale, PHB2, présente à la MMI, interagit avec la protéase PARL pour réguler son activité. En cas de dépolarisation ou d'accumulation de protéines mal conformées dans la matrice, l'interaction entre PHB2 et PARL entraînant la baisse de l'activité protéasique de PARL (Yan et al., 2020). PINK1 totale ainsi accumulée à la MME va s'activer en s'autophosphorylant à différents résidus, dont un critique dans le domaine kinase (Ser228 chez l'humain) (Rasool et al., 2018). Cette autophosphorylation se fait de façon intermoléculaire (en *trans*) (Okatsu et al., 2013). PINK1 stabilisée et ainsi autophospho-activée va phosphoryler la sérine 65 des ubiquitines (Ub) préexistantes à la surface de la mitochondrie. L'**E3 Ubiquitin ligase Parkine** est alors recrutée à la mitochondrie en se liant à ces phospho-ubiquitines (p-S65-Ub) de la membrane. PINK1 va alors pouvoir phosphoryler Parkine sur la Sérine 65 de son domaine Ubl (Ubiquitin-like), ce qui augmente son activité d'E3 ligase. Ainsi activées, PINK1 et Parkine vont décorer les protéines externes de la mitochondrie avec des chaînes de p-S65-Ub, constituant un signal de dégradation de la mitochondrie (*Figure 20*).

Plusieurs substrats de PINK1/Parkine à la MME sont bien connus (Miro1, MFN2, VDAC1 et HK1 (Okatsu et al., 2012)). Miro1 (mitochondrial Rho GTPase 1) par exemple, agit comme récepteur mitochondriale de la Parkine inactive, même en absence de dégâts à la mitochondrie et de PINK1 stabilisée (Safiulina et al., 2019). MFN2 quant à lui, s'assemble en homodimères formant un pont entre la MME et le RE et participant au maintien des MAMs (Naon et al., 2016), et la phospho-ubiquitination de MFN2 par PINK1/Parkine conduit à un « décrochage » de la mitochondrie du RE, conduisant à l'exposition des autres substrats de PINK1/Parkine (McLelland et al., 2018). Parkine peut également former un complexe moléculaire avec VDAC1, ce qui la stabilise à la MME, et permet de recruter d'autres molécules de Parkine cytosoliques (Callegari et al., 2017).

Il est important de signaler que quelques articles ont rapportés qu'outre la Parkine, d'autres E3-ligase (Gp78 (glycoprotéine 78), SIAH1 (Siah E3 Ubiquitin Protein Ligase) et ARIH1 (ariadne RBR E3 ubiquitin protein ligase 1)) peuvent être activées suite à la stabilisation de PINK1, et participer à une mitophagie alors dépendante de PINK1 et de l'ubiquitination mais indépendante de Parkine (Fu et al., 2013; Szargel et al., 2016; Villa et al., 2017).

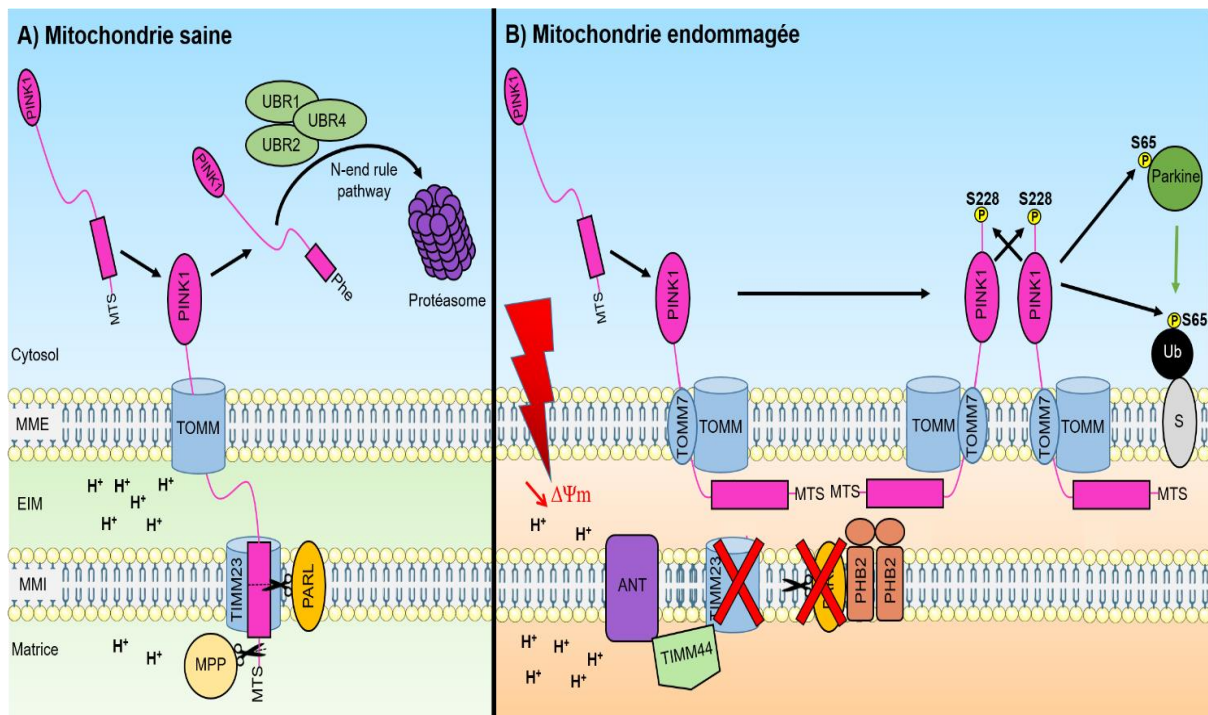


Figure 20 : Stabilisation de PINK1 à la surface de la mitochondrie endommagée et activation de la voie PINK1/Parkine. Adapté de (Pickles et al., 2018).

L'étape suivante implique des adaptateurs cytoplasmiques qui vont être recrutés, suite à l'activation de PINK1 et parkine, au niveau des protéines poly-p-S65-Ub de la MME (*Figure 21*). Ces adaptateurs vont également recruter le phagosome autour de la mitochondrie endommagée grâce à un domaine LIR (LC3-interacting region) permettant aux adaptateurs de lier les molécules de LC3-II ancrées dans la membrane du phagosome. Le plus connu et premier adaptateur identifié fût **p62/SQSTM1** (Pankiv et al., 2007), liant les agrégats de protéines ubiquitinées ou les protéines ubiquitinées de la MME et LC3-II. p62 (p62 / sequestosome 1) et normalement dégradé par les hydrolases lysosomales à la fin du processus d'autophagie. Ainsi la détection d'une accumulation de p62 est donc un signe d'un blocage de sa dégradation lysosomale, pouvant être dû à des dysfonctions du processus autophagique. Des mutations dans le gène de p62 sont connus pour causer deux MND : la sclérose latérale amyotrophique (SLA) et la démence fronto-temporal (DFT), dont certaines mutations sont communes aux deux pathologies (Le Ber et al., 2013).

Quatre autres adaptateurs mitophagiques ont été identifiés (**OPTN**, **NDP52/CALCOCO2**, **TAX1BP1** et **NBR1**). Des mutations dans le gène de l'OPTN (optineurine) sont aussi décrites pour causer la SLA (Toth and Atkin, 2018). Bien que ces cinq adaptateurs soient recrutés à la mitochondrie endommagée et sont fonctionnellement redondants, il a été rapporté dans deux études, que OPTN et NDP52 (nuclear dot protein 52) sont les récepteurs essentiels à la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante, que TAX1BP1 (Tax1 Binding Protein 1) est un récepteur moins important et que NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1 protein) et p62 semblent dispensables (Heo et al., 2015; Lazarou et al., 2015). Un autre adaptateur particulier connu pour recruter le phagosome après activation de PINK1/Parkine est la PHB2 (Wei et al., 2017). Contrairement aux autres adaptateurs, PHB2 est à la MMI et ne se lie pas aux protéines poly-phospho-ubiquitinées de la surface de la mitochondrie. En fait, la dégradation des protéines p-S65-Ub de la surface par le protéasome, provoque des ruptures de la MME, ce qui va localement exposer PHB2 au cytoplasme et permettre la liaison PHB2-LC3-II grâce à son domaine LIR (Wei et al., 2017). Cette possibilité de recruter le phagosome à la fois par des adaptateurs de la MME et de la MMI, permettrait d'améliorer l'efficacité et la spécificité de la mitophagie.

c) Mitophagie PINK1/Parkine-indépendante

Les mitochondries peuvent également être engagées dans le processus mitophagique indépendamment de l'activation de PINK1/Parkine et de l'ubiquitination mitochondriale qui en découle, dans les cas de la mitophagie programmée ou induite par certains stress comme l'hypoxie ou la carence en nutriments. Ce type de mitophagie va impliquer des récepteurs mitophagiques présents à la MME ou à la MMI. Ils peuvent être protéiques (**NIX/BNIP3L** (Nip3-like protein X), **BNIP3**, **FUNDC1**, **BCL2L13**, **FKBP8**, **DISC1**, **AMBRA1** et **MCL-1**) ou lipidiques (**cardiolipine**) mais ont en commun de pouvoir recruter le phagophore autour des mitochondries en se liant au LC3-II (*Figure 21*).

NIX (Nip3-like protein X) a d'abord été décrit pour son implication dans la mitophagie programmée pour éliminer les mitochondries durant la maturation des globules rouges (Sandoval et al., 2008). NIX a par la suite été impliqué dans la mitophagie induite par un stress hypoxique (Sowter et al., 2001) et en cas d'ischémie dans le cerveau pour y limiter les dégâts (Yuan et al., 2017). NIX a aussi été récemment décrit comme acteur de la mitophagie des mitochondries avec perte de $\Delta\Psi_{mit}$ dans les terminaisons axonales dans un contexte physiologique et dans la MA (Han et al., 2020a). BNIP3 (Bcl-2/Adenovirus E1B 19 kDa Interacting Protein 3) est aussi un récepteur mitophagique impliqué dans la mitophagie induite dans des situations d'hypoxie/ischémie (Shi et al., 2014). FUNDC1 (FUN14 Domain Containing 1) et est également un récepteur mitophagique connu pour spécifiquement participer à la mitophagie induite par l'hypoxie dans les cellules de mammifères (Liu et al., 2012). Contrairement à PINK1, ces récepteurs mitophagiques ne se lient pas à LC3-II en condition basale à cause des MPT qui leur sont appliquées. En cas de stress, leur capacité à recruter le phagophore est mobilisée, par le retrait de ces MPT et/ou par la stimulation de leur transcription (Chen et al., 2014b; Rogov et al., 2017; Zhu et al., 2013). BCL2L13 (Bcl-2 like 13) a été récemment identifié comme un récepteur mitophagique dans les cellules de mammifères (Murakawa et al., 2015) et impliqué dans la mitophagie induite par une carence en nutriments (Murakawa et al., 2019). FKBP8 (FK506-binding protein 8) est aussi un récepteur de la MME impliqué dans la mitophagie induite par un stress dépolarisant (Bhujabal et al., 2017) ainsi qu'en condition d'hypoxie et de carence en fer (Yoo et al., 2020). DISC1 est une protéine retrouvée à la fois à la MMI et à la MME, capable de lier LC3-II grâce à son motif LIR et ainsi de promouvoir la mitophagie d'une manière indépendante de Parkine (Wang et al., 2019). AMBRA1 (activating molecule in Beclin1-regulated autophagy-1) est également une protéine capable de recruter le phagophore dans la mitophagie dépendante et indépendante de PINK1/Parkine (Strappazzon et al., 2015). MCL-1 (Induced myeloid leukemia cell differentiation protein) est un récent récepteur mitophagique, capable en cas de privation d'oxygène-glucose, d'induire la fragmentation des mitochondries et, indépendamment, de lier LC3-II par son domaine LIR (Cen et al., 2020). Enfin, la cardiolipine (CL), un lipide de la MMI est aussi connu pour être transféré à la MME en présence de molécules toxiques, et de recruter le phagophore en interagissant avec LC3-II (Chu et al., 2013).

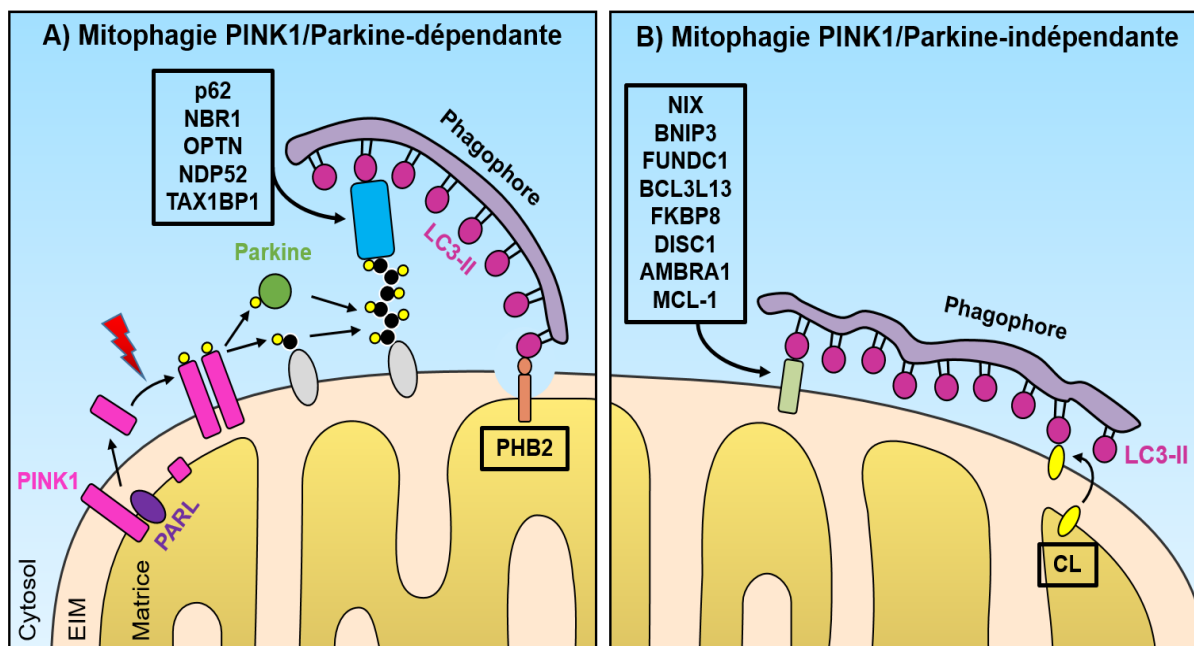


Figure 21 : Les deux types de mitophagies. Adapté de (Pickles et al., 2018).

d) *La fusion avec le lysosome et la dégradation par les hydrolases*

Les dernières étapes de tout type de mitophagie, consistent en la fusion du mitophagosome mature (fermé) avec le lysosome puis la dégradation du contenu du mitophagosome par les hydrolases acides du lysosome dans cette nouvelle vésicule formée : le mitolysosome (Figure 22). Des protéines SNARE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) sont présentes dans les membranes du mitophagosome et du lysosome, et ce sont deux complexes de protéines SNARE qui vont réaliser la fusion de ces deux vésicules : le complexe STX17-SNAP29-VAMP7/VAMP8 (Itakura et al., 2012; Saleeb et al., 2019) et le complexe STX7-SNAP29-YKT6 (Matsui et al., 2018). D'autres protéines et complexes facilitent la formation de ces deux complexes en maintenant physiquement les deux vésicules proches dans l'espace : le complexe HOPS (homotypic fusion and protein sorting), la protéine PLEKHM1 (pleckstrin homology and RUN domain containing M1) et EPG5 (ectopic P-granules autophagy protein 5 homolog). Le complexe HOPS est capable d'interagir avec la GTPase lysosomale Arl8b (Khatter et al., 2015) et avec la protéine SNARE phagosomale STX17 (Cheng et al., 2017; Jiang et al., 2014). PLEKHM1 se lie aussi à des GTPase lysosomales (Arl8b et Rab7) et se lie grâce à son domaine LIR aux molécules de LC3-II sur la membrane externe du phagosome (McEwan et al., 2015). De manière similaire, EPG5 lie Rab7 (Ras-related protein 7) et LC3-II (Wang et al., 2016b). Les lysosomes sont des vésicules renfermant plus de 50 hydrolases acides, des enzymes fonctionnant dans un milieu au pH faible, comme celui de la lumière du lysosome et capables de dégrader une grande variété de macromolécules (acides nucléiques, protéines, polysaccharides et lipides). La plupart des gènes codant pour ces enzymes lysosomales (dont les cathepsines) et pour les protéines de la membrane du lysosomes (dont les deux plus abondantes, LAMP (Lysosomal-associated membrane protein) 1 et 2) ont dans leur promoteur une séquence CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation) sur laquelle peut se fixer le facteur de transcription clé de la biogenèse des lysosomes : **TFEB (transcription factor EB)**. Il est important de noter que TFEB n'est pas seulement un régulateur important de l'expression de gènes lysosomaux, car il a aussi comme cible des gènes participant à la formation du phagosome (Bcl-1, WIPI2, ATG5 et LC3), au recrutement du phagophore (p62) et à la fusion avec les lysosomes (Rab7) (Lawrence and Zoncu, 2019). TFEB, comme l'initiateur de la mitophagie ULK1, est également régulé de façon opposée par mTORC1 et l'AMPK (Paquette et al., 2021). En condition physiologique, l'AMPK est inactif, mTORC1 est actif et va inhiber l'autophagie, notamment en phosphorylant TFEB, ce qui provoque sa rétention dans le cytoplasme. En condition de

carence en nutriments, l'AMPK s'active et inhibe mTORC1, ce qui lève les phosphorylations de TFEB qui va pouvoir être transloqué au noyau. L'AMPK phosphoryle également directement TFEB ce qui augmente son activité transcriptionnelle. La majorité des lysosomes sont détectés dans la région périnucléaire et le corps cellulaire / soma des neurones. C'est pour cela qu'un bon transport axonal est important pour le bon déroulement de la mitophagie des mitochondries éloignées (axones, synapses). Ainsi, le phagophore doit être transporté de façon antérograde vers les mitochondries distales, et les mitophagosomes doivent être transportés de façon rétrograde pour revenir au corps cellulaire et fusionner avec les lysosomes pour compléter la mitophagie. Les hydrolases du lysosome sont dites acides car fonctionnent mieux en milieu acide, et justement les lysosomes maintiennent activement le pH dans leur lumière entre 4,5 et 5, notamment grâce à l'action de la pompe à proton lysosomale v-ATPase, dont l'adressage de la sous-unité V0a1 au lysosome dépend de la fonction chaperonne de PS1 (mais pas de son action de protéase) (Lee et al., 2010a). Par la digestion lysosomale, les mitochondries sont réduites en leurs composants de base (nucléotides, acides aminés et acides gras) qui vont ensuite être réutilisés par la cellule pour la synthèse de nouveaux composants cellulaires.

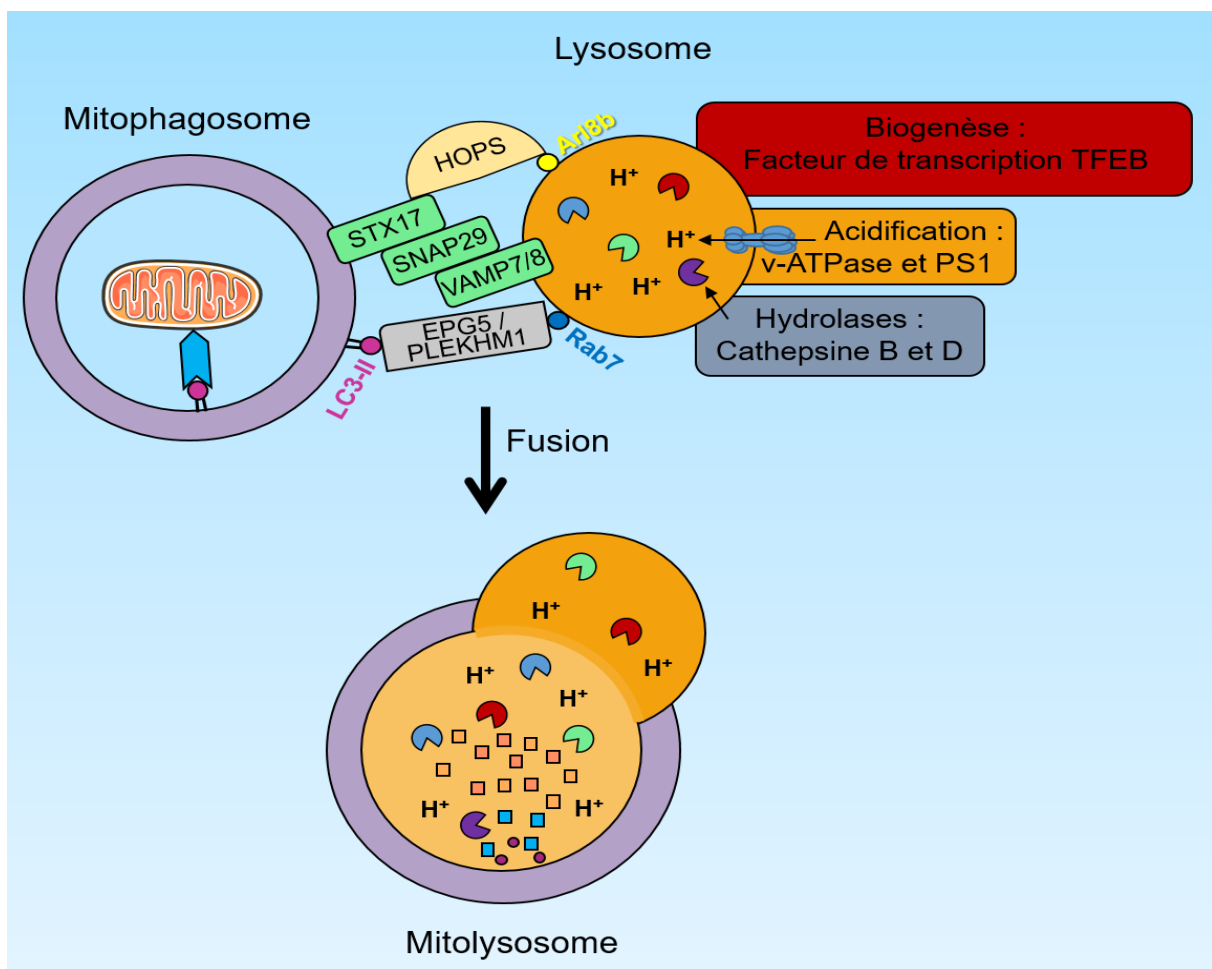


Figure 22 : Acteurs de la fusion du mitophagosome avec le lysosome et formation du mitolysosome.

B) Dysfonctions de la mitophagie dans la MA

Quel que soit le type de mitophagie en jeu et les acteurs moléculaires impliqués, le processus mitophagique permet soit le bon déroulement du développement et de la différenciation cellulaire, soit le maintien d'un « pool » de mitochondries saines. Cependant, dans certains contextes pathologiques, il

arrive que la proportion des mitochondries qui se retrouvent endommagées dépasse les capacités des cellules à pouvoir les dégrader par mitophagie. La pathologie peut directement altérer la machinerie mitophagique, diminuant alors les capacités des cellules à dégrader les mitochondries défailtantes. Une pathologie provoquant l'une et/ou l'autre de ces atteintes sera alors caractérisée par une accumulation délétère de mitochondries dysfonctionnelles. C'est le cas de la maladie d'Alzheimer.

1) Chez les patients Alzheimer

a) Etude de nécropsies de cerveaux

Depuis le début des années 2000, il a été suggéré que la dégradation mitophagique est défectueuse dans la MA, de par les observations d'accumulation d'ADNmit et de protéines mitochondriales dans le cytoplasme et les vacuoles autophagiques dans les neurones avec de dégâts oxydatifs chez des patients atteints de la MA (Hirai et al., 2001). La quasi-totalité de la littérature concerne la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante, dénommée dorénavant dans mon manuscrit : mitophagie. D'un point de vue mécanistique, il a été décrit dans les hippocampes de cas sporadiques de la MA, que durant les stades précoces (stades de Braak II-III), la masse mitochondriale (estimée par les niveaux de TOMM20 et d'ARNm 16S/MT-NRN2) augmente alors même que les niveaux de PINK1 non clivée augmente (Martín-Maestro et al., 2016). Un défaut mitophagique réside dans le fait que les niveaux de Parkine, eux, n'augmentent pas en conséquence et dans le fait que les niveaux de PINK1₅₂ augmentent également ce qui peut résulter en plus d'inhibition de la translocation mitochondriale de Parkine. Plus intéressant encore, comme les niveaux d'ARNm de PINK1 sont diminués, ainsi que ceux de Parkine, l'augmentation précoce des niveaux protéiques de PINK1 ne semble donc pas consécutive à une activation de la mitophagie mais plutôt à un défaut de la dégradation de PINK1. Ce n'est qu'au stade le plus avancé (stade VI de Braak) que les niveaux de Parkine sont augmentés, mais à ce stade, les niveaux de PINK1, eux, ne sont plus supérieurs à ceux des patients sains et la mitophagie ne semble toujours pas efficace, étant donnée l'accumulation de mitochondries à ce stade. Cela suggère donc que, du stade précoce au stade tardif de la MA, le processus de mitophagie dans les hippocampes des patients Alzheimer est affecté et qu'il existe au moins un défaut d'activation de PINK1/Parkine dès les stades précoces. D'autres études rapportent aussi une diminution des niveaux de transcrits et de protéines PINK1 dans des hippocampes à des stades de Braak V-VI (Du et al., 2017). De plus, outre PINK1 et Parkine, des niveaux d'ARNm de plusieurs autres acteurs la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante (OPTN, VDAC1 et VCP/p97) ou indépendante (BNIP3, NIX/BNIP3L et FUNDC1) sont réduits dans des cerveaux de patients atteints de la MA (Martín-Maestro et al., 2017b). Aussi, une élévation de la forme inactive et séquestrée dans le cytoplasme (pSer253) du facteur de transcription FOXO3a (forkhead box protein O3a) a été observée dans des cerveaux de patients hétérozygotes pour l'allèle APOEε4, comparé à des non-porteurs de cet allèle (Sohn et al., 2021). Par un mécanisme encore non caractérisé (bien que les auteurs rapportent qu'*in vitro* APOE4 interagit avec FOXO3a), l'expression d'APOE4 inhibe l'expression de plusieurs cibles de FOXO3a, dont notamment Bcl-1, ATG12, BNIP3 et PINK1. La mitophagie apparaît inhibée, car de pair avec la réduction des niveaux de PINK1, il y a une diminution des niveaux de p-S65-Ub associée à la non-dégradation de p62 (Sohn et al., 2021).

Dans un article très fourni datant de 2019, Fang *et al.* ont observé une accumulation de mitochondries avec des altérations structurelles (taille réduite et désorganisation des crêtes) et fonctionnelles (baisse de la production d'ATP) dans les hippocampes des patients atteints de la MA, le tout accompagné par une activité mitophagique réduite (Fang et al., 2019). Cette étude nous apprend que plusieurs étapes du processus sont déficientes dans le contexte de la MA. Au niveau de l'initiation, la kinase coordinatrice de la mitophagie AMPK est bien activée, comme attendu en cas de stress énergétique de la cellule, mais deux de ses cibles activatrices de la mitophagie, ULK1 et TBK1 (TANK binding kinase 1) sont inhibées (forte diminution de pSer555-ULK1 et pSer172-TBK1). De plus, les niveaux protéiques de LC3-II sont aussi réduits, ainsi que le nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes. Le rôle de la pathologie Tau

dans les défauts mitophagiques avait déjà été décrit en 2016, quand il avait été rapporté dans des homogénats de cerveaux de patients atteints de la MA, une accumulation de mitochondries (augmentation des niveaux de TOMM20, COX IV et du ratio ADNmit / ADNg) pour les malades présentant une accumulation des niveaux protéiques de Tau et pTau (Ser202/Thr205) (Hu et al., 2016). Cette observation a par la suite été complétée par une autre étude rapportant une accumulation de mitochondries décorées de p-S65-Ub dans des granules également positifs pour des marqueurs des dégénérescences granulo-vacuolaires (Hou et al., 2020). De plus, l'accumulation de ces granules corrèle plus avec l'accumulation précoce de pTau plutôt que de l'A β , en particulier dans l'hippocampe (Hou et al., 2020). Enfin, une étude du cortex préfrontal de patients a rapporté une baisse des niveaux protéiques de DISC1 (trois de ses quatre isoformes) chez les personnes atteintes de la MA (Wang et al., 2019). Cette donnée suggère également une perturbation de la mitophagie dans le cerveau des malades. En effet, DISC1 est une protéine qui, dans les neurones, participe à la fois au transport rétrograde des mitochondries vers le corps cellulaire (Norkett et al., 2017) et à la mitophagie PINK1/Parkine-indépendante en liant directement le LC3-II du phagophore (Wang et al., 2019).

Un défaut de l'ultime étape de la mitophagie concernant la dégradation par les hydrolases dans le mitolysosome avait été suggéré par une accumulation de mitochondries structurellement endommagées et de mitochondries dans des vacuoles autophagiques dans les neurones hippocampiques de patients atteints de la MA (Ye et al., 2015). En réaction aux dégâts mitochondriaux, les neurones semblent bien avoir activé la mitophagie puisqu'il y a une augmentation du recrutement de Parkine à la mitochondrie et des niveaux de LC3-II. Cependant, le processus ne semble pas atteindre l'étape finale de la dégradation dans le mitolysosome car à aucun stade de la MA, les niveaux de p62 ou des marqueurs mitochondriaux ne baissent. De plus, au cours de la progression de la maladie, l'accumulation de mitochondries endommagées perdure, tandis que les niveaux de Parkine cytosolique diminuent. Ces résultats ont été confirmés dans les neurones pyramidaux du CA1 de l'hippocampe de patients à un stade précoce et tardif de la maladie (Bordi et al., 2016). Dès les stades précoces, on observe une augmentation de la formation d'autophagosomes et une biogenèse lysosomale, reflétant une activation de l'autophagie, mais qui ne parvient pas à se dérouler jusqu'à son terme. En effet, le défaut de la dégradation lysosomale est appuyé par l'observation d'une accumulation et de la non-dégradation de p62. Cette explication vient aussi de l'observation au cours de la pathologie d'une accumulation d'autolysosomes de plus en plus volumineux, remplis d'un contenu non digéré. Néanmoins, les auteurs de cette étude n'ont pas démontré l'accumulation de mitochondries dans ces structures. Cependant, une autre étude concluait plutôt à une inhibition de la fusion entre les mitophagosomes et les lysosomes dans les hippocampes des malades (Fang et al., 2019). En résumé (*Tableau 2*), les études des cerveaux humains post-mortem nous indiquent qu'il existe un défaut de la dégradation mitophagique dans les neurones des malades, et ce, dès les premiers stades de la maladie affectant différentes étapes du processus de dégradation mitochondriale. Néanmoins, même si ces études ont identifié le défaut de la mitophagie comme un mécanisme clé et potentiellement commun aux différentes formes de la MA, l'implication spécifique des différents acteurs de la pathologie (Tau, A β et APOE) n'a été élucidée que par les études des tissus périphériques (voir paragraphe suivant) et formellement démontrée par les études sur des modèles cellulaires et animaux mimant la MA (voir étude de modèles *in vitro* et *in vivo* de la MA).

Tableau 2 : Altérations du processus mitophagique par l'étude de nécropsies de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer sporadique. Ces altérations incluent des augmentations (↑), des diminutions (↓), ou des absences de changement (=) de phénotypes, d'événements ou de niveaux d'ARNm ou protéines dans des nécropsies de cerveaux de patients atteints d'une forme sporadique de la MA.

	Phénotypes	Modulations moléculaires sous-jacentes observées	Bilan de l'activité mitophagique	Références
Hippocampes stades précoces Braak II-III	↑ Masse mitochondriale	↑ TOMM20 (protéine) et 16S/MT-NRN2 (ARNm mitochondrial)	Défauts d'activation de PINK1/Parkine	(Martin-Maestro <i>et al.</i> 2016) (Ye <i>et al.</i> 2015)
	↓ Activation de PINK1/Parkine	↑ PINK1 et PINK1 ₅₂ (protéines) = Parkine (protéine) ↓ Parkine cytosolique (protéine)		
Hippocampes et cortex frontal stades tardifs Braak V-VI	↑ Masse mitochondriale	↑ TOMM20 (protéine) et 16S/MT-NRN2 (ARNm mitochondrial)	Défauts d'activation de PINK1/Parkine	(Martin-Maestro <i>et al.</i> 2016) (Du <i>et al.</i> 2017) (Martin-Maestro <i>et al.</i> 2016) (Martin-Maestro <i>et al.</i> 2016) (Ye <i>et al.</i> 2015) (Watzlawik <i>et al.</i> 2020)
	↓ Activation de PINK1/Parkine	↓ PINK1 (ARNm et protéine) = PINK1 et PINK1 ₅₂ (protéines) ↑ Parkine (protéine) ↓ Parkine cytosolique (protéine)		
	↑ Mitochondries marquées pour la dégradation	↑ p-S65-Ub (protéine)		
Sans stade en particulier	↑ Mitochondries endommagées	↑ Nombre de mitochondries endommagées (microscopie électronique)	Blocage du processus mitophagique à diverses étapes	(Fang <i>et al.</i> 2019; Ye <i>et al.</i> 2015) (Fang <i>et al.</i> 2019) (Fang <i>et al.</i> 2019) (Martin-Maestro <i>et al.</i> 2016) (Ye <i>et al.</i> 2015) (Martin-Maestro <i>et al.</i> 2017) (Hou <i>et al.</i> 2020) (Ye <i>et al.</i> 2015) (Martin-Maestro <i>et al.</i> 2017) (Wang <i>et al.</i> 2019) (Fang <i>et al.</i> 2019) (Ye <i>et al.</i> 2015)
	↓ Initiation de la mitophagie	↑ pT172 AMPK (protéine) ↓ pS555 ULK1 et pS172 TBK1 (protéines)		
	↓ Nombre de phagophores	↓ LC3-II (protéine)		
	↓ Activation de la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante	↓ PINK1 et Parkine (ARNm) ↑ Parkine (protéine fraction mitochondriale) ↓ OPTN, VDAC1 et VCP/p97 (ARNm)		
	↑ Mitochondries marquées pour la dégradation	↑ p-S65-Ub (protéine)		
	↑ Recrutement du phagophore	↑ LC3-II / I (protéine fraction mitochondriale)		
	↓ Activation de la mitophagie PINK1/Parkine-indépendante	↓ NIX, BNIP3 et FUNDC1 (ARNm) ↓ DISC1 (protéine)		
	↓ Formation de mitolysosomes	↓ colocalisation TOMM20 – LAMP2		
	↓ Dégradation lysosomale	↑ p62 (protéine fraction mitochondriale) = p62, TOMM20 et HSP60 (protéines) ↑ Nombre de mitochondries dans les vésicules autophagiques (microscopie électronique)		
Porteurs d'un allèle APOEε4	↓ Activité de FOXO3a	↓ FOXO3a (protéine totale) ↑ pSer253 FOXO3a (protéine)	Blocage du processus mitophagique lors des premières étapes	(Sohn <i>et al.</i> 2021)
	↓ Formation de phagosomes	↓ Bcl-1 et ATG12 (protéines)		
	↓ Activation de PINK1/Parkine	↓ PINK1 (protéine) ↓ p-S65-Ub (protéine)		
	↓ Dégradation lysosomale	= p62 (protéine)		

b) Etude de tissus périphériques

De manière intéressante, les **fibroblastes**, cellules périphériques du derme obtenues à partir de biopsies de peau, provenant des patients atteints de la MA présentent aussi des altérations mitochondriales et mitophagiques. Les mitochondries y sont plus nombreuses et ont des difficultés à restaurer leur $\Delta\Psi_{mit}$

après un stress (Martín-Maestro et al., 2016). La mitophagie est également déficiente dans les fibroblastes de patients atteints d'une forme sporadique de la MA, où l'on observe une réduction du recrutement de Parkine à la mitochondrie et de sa phosphorylation par PINK1 même après stimulation de la mitophagie (traitement au CCCP induisant la dépolarisation de la membrane mitochondriale). De plus, la formation de vésicules autophagiques et le nombre de lysosomes sont aussi diminués (Martín-Maestro et al., 2016). Globalement, les fibroblastes de patients sporadiques possèdent une accumulation de mitochondries âgées et des difficultés à les dégrader par mitophagie (Martín-Maestro et al., 2017b). Des mitochondries plus âgées et moins dégradées, c'est également la conclusion des auteurs d'un autre article ayant utilisé la sonde MitoTimer qui possède une émission de fluorescence dont la longueur d'onde se décale au cours de la maturation des mitochondries (Drabik et al., 2021). Avec cette sonde, ils ont également déterminé que les fibroblastes des patients sains, mais pas ceux des patients sporadiques, possédaient un gradient de maturation des mitochondries, avec des mitochondries jeunes à la périphérie de la cellule (Drabik et al., 2021). Enfin, ils rapportent aussi un défaut de la mitophagie caractérisée par une diminution des niveaux de PINK1 et Bcl-1, une élévation du ratio LC3-II/I mais une absence de la dégradation de p62 et un maintien de la masse mitochondriale (Drabik et al., 2021). Martín-Maestro *et al.* ont également rapporté des défauts d'autophagie et de mitophagie dans les fibroblastes et **iPSC différenciées en neurones** provenant de patients avec la mutation PS1 (A246E) (Martín-Maestro et al., 2017a). Dans ces deux types de cellules, l'autophagie est activée mais non effective car LC3-II s'accumule mais p62 n'est pas dégradé, à cause des capacités réduites de dégradation lysosomale, provoquant également l'accumulation de mitochondries. Cependant, à la différence des patients sporadiques, les fibroblastes PS1 (A246E) ont bien une augmentation des niveaux de Parkin à la mitochondrie, permettant leur adressage jusque dans les mitolysosomes où elles ne sont pas dégradées à cause de problèmes lysosomaux (Martín-Maestro et al., 2017a). Ainsi, les lysosomes des fibroblastes PS1 (A246E) sont gonflés et moins acides et la pro-Cathepsine B est moins clivée en sa forme d'hydrolase active. Une des fonctions physiologiques de la PS1 est l'adressage de la v-ATPase au lysosome et donc son acidification (Lee et al., 2010a). La mutation familiale PS1 (A246E) entraîne une alcalinisation lysosomale, et une réduction de l'activité de l'hydrolase Cathepsine D (Coffey et al., 2014; Lee et al., 2010a). L'autophagie et la mitophagie en particulier ont également été étudiées dans des neurones corticaux dérivés d'iPSCs à partir de fibroblastes de patients APP (V717L) et *APOE4* et semblent également déficients (Fang et al., 2019). Les niveaux de LC3-II sont diminués ainsi que le nombre d'autophagosomes et autolysosomes. Pour ce qui est de la mitophagie, TBK1 et ULK1 sont moins activés et les niveaux protéiques de Bcl-1, PINK1, AMBRA1, BCL2L13 et FUNDC1 sont réduits (Fang et al., 2019). Enfin, la mitophagie a été étudiée dans des **iPSC différenciées en cellules souches neurales (CSN)** avec un knock-in (KI) de la mutation PS1 (M146L) (Martín-Maestro et al., 2019). Le but étant de savoir si un défaut mitophagique est présent dans ce type cellulaire. De façon similaire, ces cellules montrent une activation de la mitophagie, avec une augmentation des niveaux de PINK1 et du recrutement de Parkine à la mitochondrie, mais l'étape de recrutement du phagophore semble être inhibée vu la colocalisation réduite entre TOMM20 et LC3. De plus, l'expression de TFEB et de LAMP1 sont également réduites, indiquant une réduction des capacités lysosomales. Tout cela résulte en une accumulation de mitochondries (Martín-Maestro et al., 2019). Enfin, une étude a utilisé le modèle de **cellules cybrides** (cytoplasmic hybrid) (Du et al., 2021). Il s'agissait de cellules humaines de type neuronal (SH-SY5Y) vidées de leur contenu mitochondrial puis complétées par les mitochondries issues de cellules de plaquettes de patients atteints de la MA ou non en contrôle. Il se trouve que les cybrides-Alzheimer ont un défaut de mitophagie (baisse des niveaux de PINK1), de la structure des mitochondries (diminution de la longueur de leurs mitochondries) et de leur activité (baisse d'activité du Cytochrome C oxydase et de la production d'ATP, et une augmentation de la production de ROSmit). Une surexpression de PINK1 par une approche lentivirale a permis d'inverser tous ces phénotypes.

De façon importante, une diminution du niveau protéique de Parkine et Bcl-1 a été également observée dans le **sérum de patients** atteints de la MA (Castellazzi et al., 2019). Par ailleurs, une baisse des niveaux d'ARNm Parkine en concomitance avec une augmentation de ceux de PINK1 et LC3 a été détectée dans le **plasma des malades** Alzheimer (Pakpian et al., 2020). La perturbation de l'activation

de PINK1/Parkine dans la MA semble donc être détectable même en dehors du CNS et pourrait en faire un candidat pour le développement d'un biomarqueur sanguin. D'ailleurs, une équipe a déjà mis au point un ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) sandwich capable de détecter les niveaux de p-S65-Ub dans le sang humain (Watzlawik et al., 2020). Par cette technique, ils ont observé une augmentation des niveaux de p-S65-Ub dans le cortex frontal de patients à des stades de Braak avancés (V-VI), signe qu'il y a plus de mitochondries endommagées et marquées pour la mitophagie et/ou que la machinerie mitophagique est défectueuse (Watzlawik et al., 2020).

En conclusion, le défaut du processus mitophagique a été rapporté dans les fibroblastes de patients sporadiques ou avec des mutations monogéniques, dans des iPSC différenciées en neurones ou cellules souches neurales exprimant également des mutations monogéniques ou l'APOE4, et dans des cybrides. Plusieurs étapes semblent être perturbées, comme l'activation correcte de PINK1/Parkine à la mitochondrie, le recrutement du phagophore et, de façon quasi systématique, les capacités de dégradation des lysosomes sont réduites, aboutissant à la non-dégradation et à l'accumulation de mitochondries altérées (*Tableau 3*).

Tableau 3 : Altérations du processus mitophagique dans les tissus périphériques de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Ces altérations incluent des augmentations (↑) ou des diminutions (↓) de phénotypes, d'événements ou de niveaux d'ARNm ou protéines dans les études de tissus périphériques de malades Alzheimer sporadique ou familiaux portant des mutations monogéniques. CSN : cellule souche neurale ; KI : knock in.

	Phénotypes	Modulations moléculaires sous-jacentes observées	Bilan de l'activité mitophagique	Références
Plasma		↑ PINK1 et LC3 (ARNm) ↓ Parkine (ARNm)	Signe d'un défaut de l'activation de PINK1/Parkine dans la périphérie	(Pakpian <i>et al.</i> 2020)
Sérum		↓ Parkine et ATG5 (protéines)		(Castellazzi <i>et al.</i> 2019)
Fibroblastes sporadiques	↑ Masse mitochondriale ↓ Activation de PINK1/Parkine ↓ Recrutement de Parkine ↓ Nombre de lysosomes	↑ TOMM20 (protéine) ↓ Parkine (protéine) ↓ colocalisation Parkine – SCaMC-1 ↓ LAMP1 (protéine)	Défauts d'initiation et de dégradation	(Martin-Maestro <i>et al.</i> 2016)
	↑ Age des mitochondries ↓ Activation de PINK1/Parkine ↑ Nombre de phagophores ↓ Dégradation lysosomale	↑ Maturation des mitochondries (sonde MitoTimer) ↓ PINK1 (protéine) ↑ Ratio LC3-II / I (protéine) = p62 (protéine) et masse mitochondriale (MitoTraker)	Défauts d'initiation et de dégradation	(Drabik <i>et al.</i> 2021)
Fibroblastes PS1 (A246E)	↑ Masse mitochondriale ↑ Activation de PINK1/Parkine ↑ Recrutement de Parkine ↑ Recrutement du phagophore ↓ Capacités lysosomales	↑ TOMM20 (protéine) ↑ Parkine (protéine) ↑ colocalisation Parkine - TOMM20 ↑ colocalisation LC3 - TOMM20 ↓ Acidification des lysosomes	Activation mais défaut de dégradation	(Martin-Maestro <i>et al.</i> 2017)
iPSC différenciés en neurones PS1 (A246E)	↑ Masse mitochondriale ↑ Activation de PINK1/Parkine ↑ Recrutement de Parkine ↓ Capacités lysosomales	↑ TOMM20 (protéine) ↑ PINK1 et Parkine (protéines) ↑ colocalisation Parkine - TOMM20 ↓ Activation de la pro-Cathepsine B	Activation mais défaut de dégradation	(Martin-Maestro <i>et al.</i> 2017)
iPSC différenciés en neurones APP (V717L) et APOE4/APOE4	↓ Initiation de la mitophagie ↓ Activation de PINK1/Parkine ↓ Activation de la mitophagie PINK1/Parkine-indépendante	↓ Bcl-1 (protéine) et phosphorylation d'ULK1 (S555) et TBK1 (S172) ↓ PINK1 (protéine) ↓ AMBRA1, BCL2L13 et FUNDC1 (protéine)	Défauts de déclenchement du processus	(Fang <i>et al.</i> 2019)
iPSC différenciés en CSN avec KI PS1 (M146L)	↑ Masse mitochondriale ↑ Activation de PINK1/Parkine ↑ Recrutement de Parkine ↓ Recrutement du phagophore ↓ Capacités lysosomales	↑ TOMM20 (protéine) et nombre de copies d'ADNmit ↑ PINK1 et Parkine (protéines) ↑ colocalisation Parkine - TOMM20 ↓ colocalisation LC3 - TOMM20 ↓ TFEB et LAMP1 (ARNm et protéines)	Activation mais blocage en aval	(Martin-Maestro <i>et al.</i> 2019)
Cybrides neuronaux	↓ Activation de PINK1/Parkine	↓ PINK1 (protéine)	Activation mais blocage en aval	(Du <i>et al.</i> 2021)

2) Mitophagie dans les modèles d'étude *in vitro* et *in vivo* de la MA

a) Contribution de Tau

L'impact d'une forme tronquée de la protéine Tau sur la mitophagie a été étudié en 2014 (Amadoro *et al.*, 2014). Il s'agit du **fragment NH₂hTau**, correspondant aux acides aminés 26 à 230 de la protéine Tau humaine, déjà connu pour s'accumuler dans les mitochondries neuronales des synapses (Amadoro

et al., 2010). NH₂hTau semble avoir un impact pathologique en sur-stimulant la dégradation des mitochondries par mitophagie (Amadoro et al., 2014). En effet, son expression dans des neurones primaires hippocampiques de rats conduit à la fragmentation des mitochondries et à la désorganisation des crêtes mitochondriales, aux dysfonctions synaptiques ainsi qu'à une augmentation de l'activité mitophagique associée à une diminution de la masse mitochondriale (Amadoro et al., 2014). Cette étude a également démontré que NH₂Tau est capable de se lier de façon stable avec Parkine au niveau des mitochondries synaptiques. Ainsi, l'inhibition de la mitophagie par shRNA anti-Parkine est capable de protéger les synapses et la masse mitochondriale des effets de NH₂Tau (Corsetti et al., 2015). Cependant, d'autres études concluent plutôt à un effet de blocage de la mitophagie liée à l'accumulation de la **protéine Tau humaine totale et sauvage (hTau)** (Cummins et al., 2019; Hu et al., 2016). La surexpression de hTau dans des cellules HEK et des neurones hippocampiques primaires de souris conduit à une accumulation de hTau et pTau au niveau de la MME, à une hyperpolarisation de la mitochondrie (augmentation du $\Delta\Psi_m$), empêchant la stabilisation et l'activation de PINK1/Parkine à la mitochondrie, le tout résultant en une accumulation de mitochondries (Hu et al., 2016). De plus, la surexpression de hTau et **hTau mutée (P301L)**, une mutation associée à la DFT, dans des cellules de neuroblastomes et chez le nématode (*Caenorhabditis elegans*) conduit également à un blocage de la mitophagie (Cummins et al., 2019). Aucune modification du $\Delta\Psi_m$ n'a été détectée dans ces modèles, mais, de nouveau, il a été observé pour hTau et Tau (P301L), mais pas Tau endogène, une interaction entre leurs domaines de projection et Parkine cytosolique, empêchant la translocation de Parkine à la mitochondrie endommagée (Cummins et al., 2019). Une autre forme de Tau, la **hTau F3ΔK280 pro-agrégante**, exprimée dans les neurones d'une souche de *C. elegans* (BR5270) conduit également à une dysfonction des mitochondries et à une diminution de l'activité mitophagique, évaluée par la colocalisation entre les orthologues de LC3 et de BNIP3/NIX (Fang et al., 2019). Pour éviter l'écueil des modèles avec surexpression, il a récemment été développé des modèles *C. elegans* transgéniques exprimant une seule copie de hTau ou de hTau modifiée pour mimer des MPT, retrouvées dans la MA, qui perturbent la capacité de Tau à lier les microtubules (T231E pour mimer la phosphorylation de ce résidu (Sengupta et al., 1998) et K274/281Q pour mimer l'acétylation de ces deux lysines (Sohn et al., 2016)) (Guha et al., 2020). Les neurones des nématodes exprimant **MPT-mimétique hTau** présentent une réduction du nombre de mitolysosomes et une incapacité à déclencher le processus mitophagique après inhibition du complexe I (paraquat) (Guha et al., 2020).

Ces résultats démontrent que la protéine Tau sous différentes formes est capable d'influencer la mitophagie en l'inhibant comme c'est le cas de hTau sauvage, et des mutants hTau P301L, hTau F3ΔK280 et des MPT-mimétique de Tau, ou en la sur-activant de manière pathologique comme c'est le cas du fragment NH₂hTau (*Tableau 4 et Figure 23.B*).

Tableau 4 : Impacts de différentes formes de Tau sur la mitophagie dans les modèles d'études de la MA. Ces impacts incluent des augmentations (↑) ou des diminutions (↓) de phénotypes, d'événements ou de niveaux d'ARNm ou protéines dans les études de modèles de la MA *in vitro* et *in vivo*. MPT : modification post-traductionnelle ; CA3 : corne d'Ammon 3 ; *C. elegans* : *Caenorhabditis elegans* ; IF : immunofluorescence.

Espèce de Tau	Modèles	Phénotypes	Modulations moléculaires sous-jacentes observées	Bilan de l'activité mitophagique	Références
NH ₂ hTau	Neurones primaires hippocampiques de rat	↓ Masse mitochondriale	↓ TOMM20, VDAC1, TIMM23, CytC, ATPB et Mn-SODII (protéines) ↓ Ratio ADNmit/ADNg	Stimulation excessive de la dégradation mitophagique	(Amadoro <i>et al.</i> 2014)
		↑ Nombre de phagophores	↑ LC3-II (protéine)		
		↑ Activation de PINK1/Parkine	↑ PINK1 (protéine)		
		↑ Recrutement de Parkine	↑ Parkine (protéine fraction mitochondriale)		
		↑ Dégradation lysosomale	↓ p62 (protéine)		
Souris Tg2576 (6 mois)	↑ Recrutement de Parkine	↑ Parkine (protéine fraction mitochondriale)	Stimulation excessive du recrutement de Parkine	(Corsetti <i>et al.</i> 2015)	
hTau	Cellules HEK293T neurones primaires hippocampiques de souris et souris hTau dans le CA3 (4 mois)	↑ Masse mitochondriale	↑ TOMM20 et COX IV (protéines) ↑ Ratio ADNmit/ADNg	Blocage de l'activation de PINK1/Parkine	(Hu <i>et al.</i> 2016)
		↑ Nombre de phagophores	↑ LC3-II (protéine)		
		↓ Activation de PINK1/Parkine	↑ Potentiel de membrane ↓ PINK1 (protéine fraction mitochondriale)		
		↓ Recrutement de Parkine	↓ Parkine (protéine fraction mitochondriale)		
		↓ Dégradation lysosomale	↑ p62 (protéine)		
hTau (P301L)	Cellules de neuroblastomes murins (N2a) souris pR5 (14 mois) nématode <i>C. elegans</i>	↓ Recrutement de Parkine	↓ Parkine à la mitochondrie (IF) ↑ Interaction hTau (P301L) – Parkine dans le cytosol	Blocage du recrutement de Parkine et de la dégradation	(Cummins <i>et al.</i> 2019)
		↓ Mitochondries marquées pour la dégradation	↓ Ubiquitination mitochondriale (IF)		
		↓ Dégradation lysosomale	Non-dégradation de mitochondries dans les mitolysosomes (sonde mito-QC)		
hTau F3ΔK280	<i>C. elegans</i> (BR5270)	↓ Recrutement du phagophore	↓ Colocalisation LC3 – BNIP3/NIX	Défaut de recrutement du phagophore	(Fang <i>et al.</i> 2019)
hTau T231E et K274/281Q (MPT-mimétique)	<i>C. elegans</i>	↓ Formation de mitolysosomes	↓ Nombre de mitolysosomes (sonde Mito-mKeima)	Défaut de formation de mitolysosomes	(Guha <i>et al.</i> 2020)

b) Contribution de l'Aβ

In vitro, le traitement d'une lignée de phéochromocytomes de rat (PC12) avec l'Aβ₁₋₄₂ à 7μM pendant 12h cause un blocage de la mitophagie caractérisé par des niveaux réduits des initiateurs PINK1/Parkine (tendance), Bcl-1, et du ratio LC3-II/I et une non-dégradation de l'adaptateur p62 (Wang *et al.*, 2020c). Étonnamment, le traitement chronique des cellules PC12 avec l'Aβ₁₋₄₂ pendant 24h à des concentrations similaires, entraîne une augmentation des niveaux d'initiateurs de la mitophagie (Bcl-1, Parkine et LC3-II/I), ce qui semble plutôt en faveur d'une stimulation de la mitophagie (Wang *et al.*, 2018a). Une élévation des initiateurs (PINK1/Parkine, Bcl-1 et LC3-II) a également été observée après un traitement chronique de neurones hippocampiques embryonnaires murins avec l'Aβ₁₋₄₂ pendant 72h (Zhang *et al.*, 2021). Les neurones traités montrent des mitochondries dysfonctionnelles (une réduction du ΔΨ_m et de la production d'ATP et une augmentation des niveaux de ROSmit). Les auteurs ont également montré un blocage de la fusion entre le mitophagosome et le lysosome (Zhang *et al.*, 2021).

Le traitement de cellules humaines non neuronales (HEK293) avec de l' $A\beta_{01-42}$, semble aussi produire une initiation d'une mitophagie non effective, bloquée dans les dernières étapes du processus mitophagique (augmentation des niveaux de Parkine et de LC3-II, une non-dégradation de p62 et une accumulation des mitochondries et des mitophagosomes) (Wang et al., 2020a). De manière surprenante, dans les neuroblastomes humains différenciés (SK-N-BE), c'est le traitement à l' $A\beta_{1-42}$ **monomérique** ($A\beta_{m1-42}$), plus que l' $A\beta_{01-42}$, qui cause un fort blocage de l'autophagie, avec une accumulation de l'adaptateur p62 et d'autophagosomes accompagné d'une réduction de l'activité lysosomale (Guglielmotto et al., 2014). En résumé, ces résultats indiquent que des traitements courts avec le peptide $A\beta_{1-42}$ (mimant les phases précoces de la MA) causent un blocage de la mitophagie, en perturbant son initiation et que des traitements chroniques (mimant les phases tardives de la MA) entraînent une initiation de la mitophagie accompagnée d'un blocage de la formation des mitolysosomes. Ces observations *in vitro* ont été consolidés *in vivo*. Ainsi, des injections stéréotaxiques du peptide $A\beta_{1-42}$ dans le CA1 chez le rat ont produit un blocage de l'initiation de la mitophagie, avec une réduction des niveaux de PINK1, Parkine et Bcl-1 et une accumulation de p62 (Han et al., 2020b). De même, l'expression du peptide $A\beta_{1-42}$ chez *C. elegans* induit aussi une réduction de l'activité de la mitophagie (Fang et al., 2019). Par ailleurs, alors que l'accumulation du peptide $A\beta$ dans le modèle de souris hAPP^{swe}/Ind exprimant une APP humaine avec les mutations suédoises (K670N/M671L) et Indiana (V717F) réduit l'activité mitophagique notamment via la diminution des niveaux de PINK1, la surexpression de PINK1 restore la mitophagie et est capable de réduire la quantité d'APP et de l' $A\beta$ cellulaire et mitochondriale, la quantité de plaques séniles tout en restaurant le fonctionnement des mitochondries (Du et al., 2017). De plus, dans les souris hAPP^{swe}/Ind, il a été rapporté une interaction des peptides $A\beta$ solubles et $A\beta_0$ avec les vacuoles autophagiques, bloquant ainsi leur transport rétrograde et aboutissant à leur accumulation dans les parties terminales du neurone (Tammineni et al., 2017).

Ces résultats démontrent que différentes espèces de l' $A\beta$ ($A\beta_{1-42}$, $A\beta_{01-42}$ et $A\beta_{m1-42}$) impactent le processus mitophagique, notamment les étapes d'activation de PINK1/Parkine et de dégradation lysosomale *in vitro* et *in vivo* (Tableau 5 et Figure 23.C).

Tableau 5 : Rôle des différentes formes de l'Aβ sur la mitophagie dans les modèles d'études de la MA. Ces altérations incluent des augmentations (↑) ou des diminutions (↓) de phénotypes, d'événements ou de niveaux d'ARNm ou protéines dans les études de modèles de la MA *in vitro* et *in vivo*. CA1 : corne d'Ammon 1 ; *C. elegans* : *Caenorhabditis elegans*.

Espèce d'Aβ	Modèles	Phénotypes	Modulations moléculaires sous-jacentes observées	Bilan de l'activité mitophagique	Références
Aβ ₁₋₄₂	Cellules PC12 de rat (7μM, 12h)	↓ Initiation de la mitophagie	↓ Bcl-1 (protéine)	Blocage de l'activation de PINK1/Parkine et de la dégradation	(Wang <i>et al.</i> 2020)
		↓ Nombre de phagophores	↓ LC3-II (protéine)		
		↓ Activation de PINK1/Parkine	↓ PINK1 et Parkine (protéines)		
		↓ Dégradation lysosomale	↑ p62 (protéine)		
	Cellules PC12 de rat (5μM, 24h)	↑ Initiation de la mitophagie	↑ Bcl-1 (ARNm et protéine)	Stimulation de l'initiation de la mitophagie	(Wang <i>et al.</i> 2018)
		↑ Nombre de phagophores	↑ LC3 (ARNm) et ratio LC3-II / I (protéine)		
		↑ Activation de PINK1/Parkine	↑ Parkine (ARNm et protéine)		
	Neurones hippocampiques embryonnaires murins (5μM, 72h)	↑ Initiation de la mitophagie	↑ Bcl-1 (protéine)	Stimulation de l'initiation de la mitophagie mais blocage en aval	(Zhang <i>et al.</i> 2021)
		↑ Nombre de phagophores	↑ LC3-II (protéine)		
		↑ Activation de PINK1/Parkine	↑ PINK1 et Parkine (protéines)		
		↓ Formation de mitolysosomes	↓ Formation de mitolysosomes (sonde mRFP-GFP-LC3)		
	Rats injectés dans le CA1	↓ Initiation de la mitophagie	↓ Bcl-1 (protéine)	Blocage de l'activation de PINK1/Parkine et de la dégradation	(Han <i>et al.</i> 2020)
		↓ Activation de PINK1/Parkine	↓ PINK1 et Parkine (protéines)		
		↓ Dégradation lysosomale	↑ p62 (protéine)		
<i>C. elegans</i> (CL2355)	↓ Recrutement du phagophore	↓ Colocalisation LC3 – BNIP3/NIX	Défaut de recrutement du phagophore	(Fang <i>et al.</i> 2019)	
oAβ ₁₋₄₂ (oligomérique)	Cellules HEK293T (10μM, 24h)	↑ Nombre de mitochondries	↑ Nombre de mitochondries (microscopie électronique)	Stimulation de l'initiation de la mitophagie mais blocage en aval	(Wang <i>et al.</i> 2020)
		↑ Activation de PINK1/Parkine	↑ Parkine (protéine fraction mitochondriale)		
		↑ Recrutement du phagophore	↑ LC3-II (protéine fraction mitochondriale)		
		↑ Accumulation de mitophagosomes	↑ Nombre de mitophagosomes (microscopie électronique)		
		↓ Dégradation lysosomale	↑ p62 (protéine fraction mitochondriale)		
mAβ ₁₋₄₂ (monomérique)	Neuroblastomes humains différenciés (SK-N-BE) (1μM)	↓ Initiation de la mitophagie	↑ Bcl-1 (protéine) ↓ Complexe Bcl-1 – Bcl-2 (protéine)	Blocage de la macroautophagie	(Guglielmotto <i>et al.</i> 2014)
		↑ Nombre de phagophores	↑ LC3-II (protéine)		
		↓ Formation d'autolysosomes	↑ Formation d'autophagosomes (sonde RFP-GFP-LC3) ↓ Formation d'autolysosomes (sonde RFP-GFP-LC3)		
	Neurones primaire murins (1μM)	↓ Dégradation lysosomale	↑ p62 (protéine) ↓ Activité de la Cathepsine D		

c) Contribution d'APOE4 et du cholestérol

Il a récemment été rapporté dans une lignée d'astrogliomes (T98G), que la quantité de protéines agrégées et de protéines mitochondriales préférentiellement dégradées par la mitophagie était plus importante en cas d'expression d'APOE4 par rapport à l'expression d'APOE3, suggérant un blocage de l'autophagie et de la mitophagie (Parcon *et al.*, 2018). Il a été évoqué un peu plus haut que dans les cerveaux de patients atteints de la MA, l'APOE4 impactait négativement la mitophagie en inhibant l'activité du facteur de transcription FOXO3a. De manière intéressante, il a été également décrit que l'APOE4 est

capable de bloquer l'activité de TFEB (Parcon et al., 2018). D'un point de vue mécanistique, ce blocage est dû à la liaison d'APOE4 au niveau des séquences génomiques CLEAR, ce qui fait d'APOE4 un compétiteur avec le TFEB, l'empêchant ainsi de stimuler la transcription de gènes codants par exemple pour LC3, p62 ou LAMP2 (Parcon et al., 2018). Comparées aux souris exprimant APOE3, celles exprimant APOE4 présentent aussi un blocage de la dégradation mitophagique au niveau de leurs hippocampes avec une accumulation de mitochondries présentant moins de crêtes mitochondriales (Simonovitch et al., 2019). La présence de mitochondries altérées semble bien induire la mitophagie caractérisée par une diminution des niveaux de PINK1_{S2} et une augmentation des niveaux de Parkine. Le processus semble donc bloqué durant les étapes suivantes car le niveau de protéines p62 et de marqueurs mitochondriaux augmentent (Simonovitch et al., 2019). Enfin, dans ce modèle murin d'expression d'APOE4 comparé à l'expression d'APOE3, les astrocytes présentent également une accumulation de mitochondries associée à une mitophagie basale déficiente. L'induction de la mitophagie par le CCCP est également bloquée dans ces cellules puisque les auteurs ont rapporté une accumulation de la protéine Parkine ubiquitinée, moins efficace pour initier la mitophagie et comme en témoigne la diminution des niveaux de LC3-II/I, le blocage de la formation de mitophagosomes/mitolysosomes et la non-dégradation de p62 (Schmukler et al., 2020).

Enfin, il est important de rappeler que le facteur de risque APOE ϵ 4 a été associé avec une augmentation des concentrations plasmatiques de cholestérol et un apport excessif de cholestérol dans les neurones (Lee et al., 2021b). Ainsi, il semble que l'APO4 puisse indirectement perturber la mitophagie via le cholestérol. En effet, l'**augmentation intracellulaire de cholestérol**, en lui-même, a été démontrée comme inhibant la mitophagie (Roca-Agujetas et al., 2021). Les cellules de neuroblastomes traitées avec le peptide A β ₀₁₋₄₂ (10 μ M, 24h) montrent un enrichissement aigu de cholestérol perturbant le flux mitophagique en empêchant la formation de mitolysosomes. De plus, chez des souris âgées, l'**accumulation chronique de cholestérol** induit bien l'activation de PINK1 et Parkine à la mitochondrie, et la formation de chaînes d'Ub sur les substrats de la MME (dont TOMM20) mais le processus va être bloqué par la réduction du recrutement mitochondrial de l'adaptateur OPTN, réduisant la formation de mitophagosomes (Roca-Agujetas et al., 2021).

Ces résultats indiquent que l'expression du facteur de risque APOE ϵ 4 induit des phénotypes de blocage à la fois de la mitophagie basale et induite par un stress, *in vitro* et *in vivo*. Cette mitophagie semble bien induite mais est bloquée en aval, et ce, même dans les cellules astrocytaires, une information intéressante étant donné qu'il s'agit d'un type cellulaire moins présent dans les études sur la mitophagie dans la MA (Tableau 6 et Figure 23.D).

Tableau 6 : Impacts de l'APOE4 et du cholestérol sur la mitophagie dans les modèles d'études de la MA. Ces impacts incluent des augmentations (↑), des diminutions (↓), ou des absences de changement (=) de phénotypes, d'événements ou de niveaux d'ARNm ou protéines dans les études de modèles de la MA *in vitro* et *in vivo*. Aβ₁₋₄₂ : amyloïde bêta (1-42) oligomérique ; Les techniques utilisées sont également mentionnées : PCR : polymerase chain reaction.

Acteur de la MA	Modèles	Phénotypes	Modulations moléculaires sous-jacentes observées	Bilan de l'activité mitophagique	Références
APOE4	Astroglomes humains (T98G)	↑ Agrégation de mitochondries	↑ Enrichissement de TOMM5, ATP5B, CS et SDHA dans une fraction d'agrégats (protéomique)	Blocage de la transcription de cibles de TFEB et de la dégradation	(Parcon <i>et al.</i> 2018)
		↓ Transcription d'acteurs de la mitophagie	↑ Compétition d'APOE4 avec le TFEB pour les séquences CLEAR ↓ Transcription de cibles de TFEB (LC3, p62 et LAMP2)		
	Hippocampe de souris <i>hAPOE ε4/ε4</i> (4 mois)	↑ Accumulation de mitochondries endommagées	↑ TOMM40 et COX I (protéines) Nombre de mitochondries allongées (microscopie électronique) ↓ Densité des crêtes (microscopie électronique)	Stimulation de l'initiation de la mitophagie mais blocage en aval	(Simonovitch <i>et al.</i> 2019)
		↑ Activation de PINK1/Parkine	↓ PINK1 ₅₂ (protéine) ↑ Parkine (protéine)		
		↓ Dégradation lysosomale	↑ p62 (protéine)		
	Astrocytes de souris <i>hAPOEε4/ε4</i>	↑ Accumulation de mitochondries endommagées	↑ TOMM40 et TOMM20 (protéines)	Stimulation de l'initiation de la mitophagie mais blocage en aval	(Schmukler <i>et al.</i> 2020)
		↑ Activation de PINK1/Parkine	↑ PINK1 (protéine) ↓ PINK1 ₅₂ (protéine) ↑ Parkine (ARNm et protéine fraction mitochondriale)		
		↓ Activité de Parkine	↑ Parkine ubiquitinée (protéine)		
		↓ Formation de mitophagosomes	↓ LC3-II / I (protéine fraction mitochondriale) ↓ Colocalisation Mito-GFP – LC3		
		↓ Formation de mitolysosomes	↓ Nombre de mitolysosomes (sonde mRFP-EGFP-LC3)		
		↓ Dégradation lysosomale	= p62 (protéine fraction mitochondriale) ↑ Ubiquitine (protéine fraction mitochondriale)		
	Hauts niveaux de cholestérol	Cellules de neuroblastomes humains (SH-SY5Y), traitées à l'αAβ ₁₋₄₂ (10μM, 24h)	↑ Formation de mitophagosomes	↑ Colocalisation CYC – LC3-II	Blocage de la formation de mitolysosomes
↓ Formation de mitolysosomes			↓ Colocalisation CYC – LAMP2		
Souris APP ^{swe} , PS1ΔE9, SREBF2 (8-12 mois)		↑ Accumulation de mitochondries endommagées	↑ Nombre de copies d'ADNmit (PCR) ↑ K63 poly-ubiquitinées (protéine fraction mitochondriale)	Activation de PINK1/Parkine mais blocage en aval	(Roca-Agujetas <i>et al.</i> 2021)
		↑ Activation de PINK1/Parkine	↑ PINK1 et Parkine (protéines fraction mitochondriale) ↑ PINK1 phosphorylée (protéine fraction mitochondriale)		
		↓ Recrutement du phagophore	↓ Translocation d'OPTN (protéine fraction mitochondriale)		

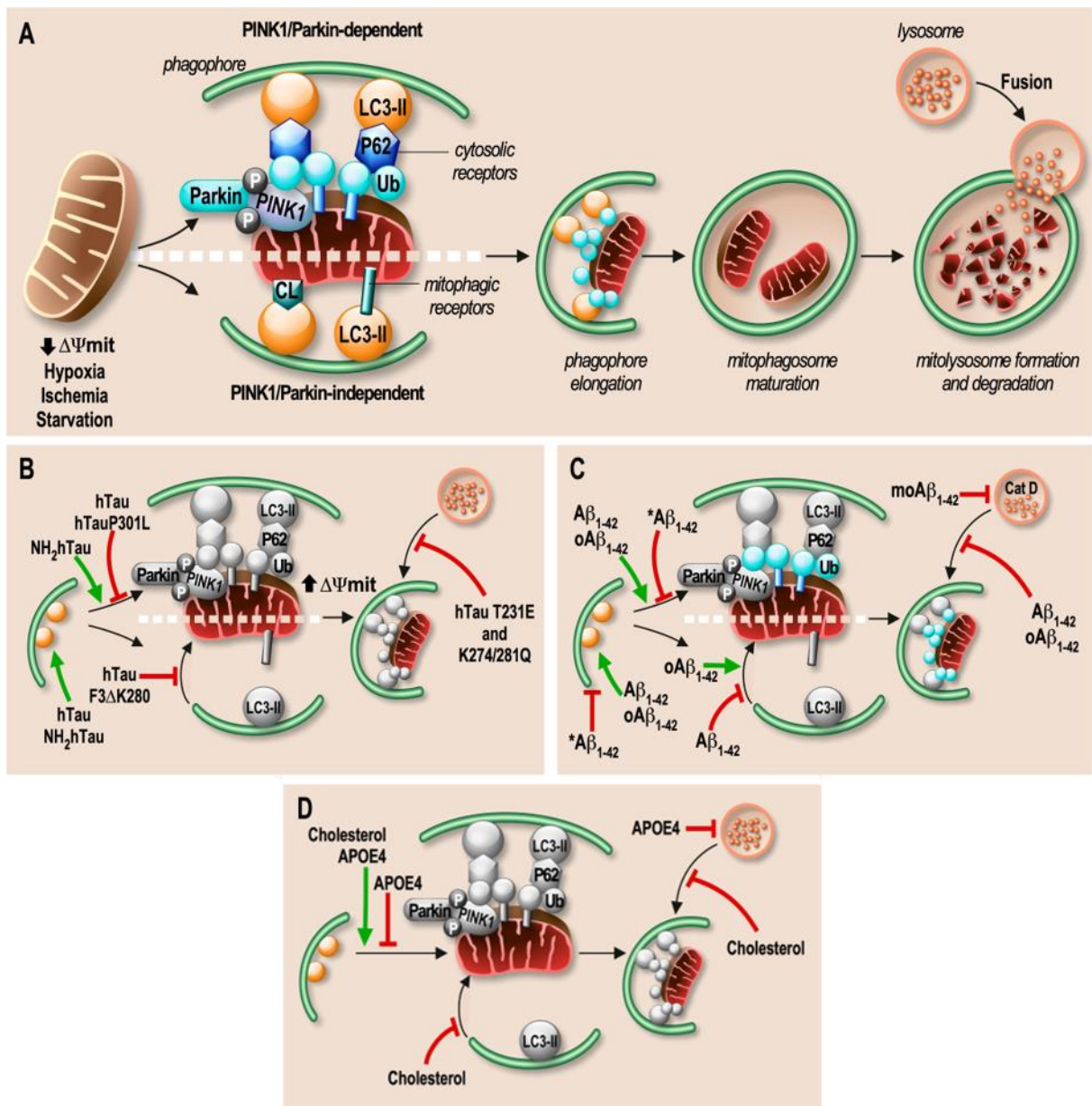


Figure 23 : Impacts des acteurs de la MA sur les étapes de la mitophagie dans les modèles d'études. Adapté de la revue en Annexe 2. A) Les étapes de la mitophagie en conditions physiologiques. Dans la MA, la mitophagie est impactée par différentes formes de Tau (B), de l'Aβ (C), et par l'APOE4 et des hauts niveaux de cholestérol (D).

Le complexe AMPK : senseur et régulateur clé de l'homéostasie des cellules

A) Structure et activation de l'AMPK

Les cellules eucaryotes régulent continuellement leur métabolisme en fonction de leur besoin énergétique et de la quantité de nutriments disponibles. Un acteur clé de cette régulation est le **complexe sérine/thréonine kinase AMPK (AMP-activated protein kinase)**. L'AMPK est un complexe fortement conservé à travers toutes les espèces eucaryotes et joue un rôle de **senseur des niveaux énergétiques**, s'activant en cas de chute de la concentration d'ATP, dans le but d'augmenter la production d'ATP et d'en réduire sa consommation. L'AMPK joue également le rôle de **senseur des niveaux de glucose dans la cellule**, s'activant suite à une baisse de la quantité de glucose cellulaire. Les nombreuses études sur ce complexe et ses cibles ont mis en lumière l'implication de l'AMPK dans la régulation de l'**homéostasie des mitochondries** et de la **réponse inflammatoire**.

1) Structure du complexe AMPK

L'AMPK est un complexe hétérotrimérique composé d'une sous-unité catalytique α et de deux sous-unités régulatrices β et γ codées par différents gènes. Il existe deux sous-unités α , α_1 et α_2 , codées respectivement par *PRKAA1* et *PRKAA2* (Stapleton et al., 1996), deux sous-unités β , β_1 et β_2 , codées par *PRKAB1* et *PRKAB2* (Thornton et al., 1998) et trois sous-unités γ , γ_1 , γ_2 et γ_3 , codés par *PRKAG1*, *PRKAG2* et *PRKAG3* (Figure 24) (Cheung et al., 2000). Cependant, un complexe AMPK fonctionnel est composé d'une seule sous-unité α , β et γ , mais toutes les combinaisons sont compatibles, rendant possible la formation de douze complexes AMPK distincts (Ross et al., 2016). Il existe des combinaisons de sous-unités majoritaires différentes selon les tissus (et même selon les types cellulaires d'un tissu donné) qui ne sont néanmoins pas statiques, car pouvant changer suite à certains stimuli. Il est fortement suspecté que les différents complexes AMPK ont des caractéristiques distinctes et jouent des rôles spécifiques. En ce qui concerne les caractéristiques spécifiques des complexes, il a été démontré que les complexes AMPK contenant la sous-unité α_2 (AMPK α_2) sont environ 25 fois plus sensibles à la déphosphorylation du résidu critique pour leur activation (Thr172 ou 174) par la PP2A α (proteine phosphatase 2A α), mais sont plus rapidement activés par l'AMP que dans le cas d'AMPK α_1 (Rajamohan et al., 2016). De plus, les complexes AMPK β_2 sont moins sensibles que les AMPK β_1 à l'activation allostérique par la molécule synthétique A-769662 (Rajamohan et al., 2016). Enfin, il existe des liens entre la composition du complexe AMPK et sa localisation subcellulaire. L'AMPK α_1 semble principalement être cytoplasmique et AMPK α_2 à la fois cytoplasmique et nucléaire, et d'ailleurs, la translocation nucléaire d'AMPK α_2 active joue un rôle physiologique dans la différenciation des cellules musculaires et participe aussi à la régulation de l'entrée du glucose dans la cellule induite par la metformine (MET) (*un activateur de l'AMPK qui sera décrit plus loin*) (Kim et al., 2014). A l'inverse, la translocation nucléaire d'AMPK α_1 est impliquée dans la mort neuronale dans le contexte de la maladie de Huntington (Ju et al., 2011).

Les deux sous-unités α portent le domaine catalytique kinase (N-terminal kinase domain (α -KD)), ainsi qu'un résidu critique pour l'activation du complexe, la **thréonine 172**, qui peut être phosphorylé par plusieurs kinases en amont de l'AMPK (*voir plus loin*). Une séquence d'import nucléaire (nuclear localization sequence (NLS)) au niveau des résidus Lys223 à Arg226 a été identifiée dans le domaine α_2 -KD, mais pas dans celui de l' α_1 -KD (Suzuki et al., 2007). Le domaine kinase est suivi d'un domaine d'auto-inhibition (α -auto-inhibitory domain (α -AID)). L'analyse des structures de ces domaines en cristallographie indique que le domaine d'auto-inhibition est capable de se lier au domaine kinase et de le maintenir dans une conformation peu active (Rajamohan et al., 2016). Cependant, les structures

cristallographiques des complexes AMPK complets et actifs montrent que l' α -AID n'est plus lié au domaine kinase mais à la sous-unité γ (Xiao et al., 2013). L' α -AID est suivi d'un domaine de liaison (α -linker), crucial pour la régulation de l'AMPK par les molécules nucléotidiques d'adénine, et est suivi d'un domaine C-terminal (α -CTD) se terminant par une séquence d'export nucléaire (nuclear export sequence (NES)) (Kazgan et al., 2010).

Les deux sous unités β portent une séquence consensus de N-myristoylation (MGNXXS) et sont effectivement myristoylées sur leur Gly2 après retrait de leur méthionine N-terminal (Oakhill et al., 2010). Cette MPT est essentielle, en cas de stress énergétique, pour la phosphorylation de la Thr172 et donc l'activation maximale du complexe, et permet également à l'AMPK de passer d'une localisation cytosolique diffuse à une association avec des membranes d'organites (Oakhill et al., 2010). Cela permet notamment à l'AMPK de se lier à la mitochondrie endommagée (suite à un traitement CCCP) pour y induire la mitophagie (Liang et al., 2015) et aux lysosomes pour y être activé dans la voie de détection d'une chute de fructose-1,6-bisphosphate (*lire plus loin*) (Zhang et al., 2017a). Les sous-unités β portent également une séquence β -CBM (β -carbohydrate-binding module) qui permet à l'AMPK de se lier à des polyglucanes tels que le glycogène (Polekhina et al., 2003). Il existe une littérature aux conclusions contradictoires quant à l'impact de la liaison du glycogène sur le β -CBM. Certains articles indiquant que la liaison du glycogène inhibe *in vitro* l'AMPK purifié (McBride et al., 2009), et que des hauts niveaux de glycogènes inhibent l'activation de l'AMPK induite dans le muscle squelettique par la contraction musculaire chez le rat (Derave et al., 2000) et chez l'humain (Wojtaszewski et al., 2003) quand d'autres n'observent pas d'effet inhibiteur de la liaison du glycogène sur l'activité de l'AMPK *in vitro* (Li et al., 2015; Polekhina et al., 2003). Le rôle physiologique de cette liaison n'est pas bien documenté, néanmoins, une étude a rapporté que des souris exprimant des complexes AMPK n'ayant plus la capacité de lier le glycogène présentaient une augmentation de dépôts de gras et une perturbation du métabolisme du glucose (Hoffman et al., 2020). Enfin, les sous-unités β ont un domaine C-terminal (β -CTD) formant le cœur de la structure hétérotrimérique, en liant les autres sous-unités α et γ .

Les sous-unités γ_2 et γ_3 possèdent, par rapport à γ_1 des extensions N-terminales de tailles et de séquences différentes et de fonctions encore inconnues. Une étude suggère que ces extensions ont un impact différentiel sur l'activation du complexe (Willows et al., 2017). Ainsi, l'extension N-terminale de la sous-unité γ_2 semble favoriser la phosphorylation de la Thr172 du complexe, même lorsqu'elle est exprimée artificiellement sur la γ_1 , ce qui semble dû à une protection contre la déphosphorylation de ce résidu par la phosphatase PP2C (Willows et al., 2017). Par ailleurs, les trois sous-unités γ_1 , γ_2 et γ_3 , contiennent quatre domaines CBS (cystathionine- β -synthase) en tandem, capables de lier les nucléotides à base d'adénine (ATP, ADP et AMP) (Xiao et al., 2007). Cependant, des études de structures en cristallographie ont révélé que la sous-unité γ peut lier uniquement trois molécules nucléotidiques d'adénine (Xiao et al., 2007). La molécule d'AMP lié sur CBS4 l'est très fortement et n'est pas échangeable en solution mais les nucléotides (AMP, ADP et ATP) liés sur CBS1 et sur CBS3 le sont de manière réversible (Xiao et al., 2007). Le site CBS2 possède une arginine à la place de l'asparagine se liant aux riboses, ce qui le rend incapable de lier les nucléotides. La liaison d'AMP, et dans une moindre mesure d'ADP, sur la sous-unité γ entraîne l'activation de l'AMPK (Gowans et al., 2013). Grâce à cette sous-unité, l'AMPK est capable de détecter en temps réel les niveaux énergétiques de la cellule et est activé en cas de stress énergétique causant une diminution du ratio ATP/AMP.

Les rôles de l'AMPK vont être détaillés ci-après, mais le fait que des gènes codant pour ses trois sous-unités sont présents dans le génome de tous les eucaryotes souligne en lui-même l'importance de l'AMPK. Cela signifie que le complexe AMPK est apparu très tôt au cours de l'évolution des eucaryotes et qu'il n'a été ni perdu ni remplacé depuis. De plus, l'événement marquant l'apparition des eucaryotes est l'endosymbiose de bactéries aérobies qui deviendront les mitochondries. Il a été évoqué l'idée que l'apparition et le maintien de l'AMPK ait pu être justifié par son rôle de lien entre la cellule hôte et ce nouvel organite capable de générer d'importantes quantités d'ATP (Lin and Hardie, 2018).

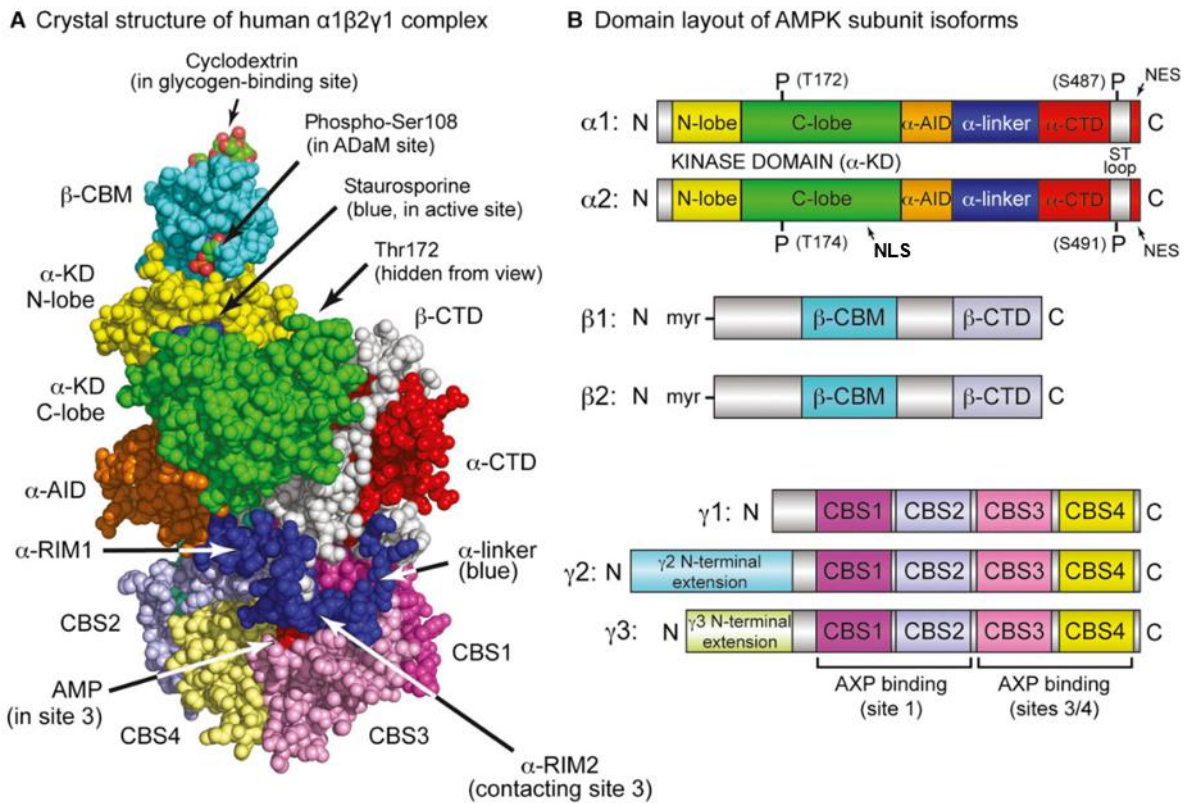


Figure 24 : Structure d'un complexe AMPK $\alpha 1\beta 2\gamma 1$ humain et schéma des différentes isoformes des sous-unités avec leurs domaines connus. (Ross et al., 2016).

2) Modulation de l'activité de l'AMPK

a) Régulations physiologiques de l'AMPK

-Trois kinases sont actuellement connues pour phosphoryler directement la Thr172 et donc activer l'AMPK : le **suppresseur de tumeurs LKB1** (liver kinase B1), la **kinase sensible au calcium CaMKK β** (Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase β) et la **kinase TAK1** (transforming growth factor β -activated kinase). LKB1 fonctionne en hétérotrimère, comme l'AMPK, avec la protéine STRAD25 (STE-20 related adaptor) et MO25 (mouse protein 25) (Hawley et al., 2003). Les études de souris dans lesquelles le gène de LKB1 a été génétiquement inactivé ont démontré que LKB1 est le principal activateur de l'AMPK en cas de stress énergétique dans les tissus examinés (Ollila and Mäkelä, 2011; Shan et al., 2015). L'AMPK peut également être phospho-activé sur sa Thr172, en réponse à un influx de calcium, via la CaMKK β (Woods et al., 2005). Ainsi, une augmentation de la concentration en calcium intracellulaire ([Ca²⁺]_i) provoque l'activation de l'AMPK indépendamment de LKB1 et des niveaux en nucléotides d'adénine. La CaMKK β est décrite pour être capable d'activer l'AMPK suite à des stress cellulaires comme une privation en acides aminés (Ghislat et al., 2012) ou l'hypoxie (Mungai et al., 2011). Enfin, TAK1 a été rapporté en 2006 comme étant capable de phospho-activer l'AMPK sur la Thr172 *in vitro* (Momcilovic et al., 2006), mais les études ultérieures indiquent que TAK1 est la moins importante des kinases de l'AMPK, que l'activation de TAK1 ne résulte pas toujours en l'activation de l'AMPK (Herrero-Martín et al., 2009) et que l'activation de l'AMPK par TAK1 dépend du contexte et peut avoir lieu en absence de stress énergétique (Neumann, 2018). En fait, comme TAK1 est connue pour être un régulateur de la mort et de la survie cellulaire (Mihaly et al., 2014), en réponse à la liaison de TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) sur leur récepteurs, TAK1 s'active et phospho-activer l'AMPK en Thr172 pour induire une autophagie cytoprotectrice (Herrero-Martín et al., 2009). De

plus, la stimulation du SO (traitement belinostat) dans des cellules cancéreuses provoque l'activation de TAK1 puis de l'AMPK et résulte en une induction de l'apoptose (Wang et al., 2013).

-L'AMPK peut être activé par différents stress qui vont se répercuter sur les niveaux énergétiques de la cellule, comme par exemple la carence en nutriments, l'ischémie et le SO (Hinchey et al., 2018). L'AMPK réagit dans ces conditions à la **réduction du ratio ATP/AMP** que ces stress provoquent. En effet, alors que la liaison d'ATP sur la sous-unité γ réduit la phosphorylation de la Thr172 (Davies et al., 1995; Hawley et al., 1995; Oakhill et al., 2011), en cas de stress énergétique, la quantité d'AMP va augmenter dans la cellule et va être détectée par la sous-unité γ de l'AMPK. La liaison d'AMP sur cette sous-unité va conduire à l'activation du complexe par trois mécanismes distincts : 1) par **activation allostérique**, en rendant l'AMPK un meilleur substrat pour la phosphorylation de Thr172 par des kinases en amont (Cheung et al., 2000; Gowans et al., 2013), 2) en **stimulant directement l'activité de phosphorylation de Thr172** par LKB1 et CaMKK β (Gowans et al., 2013; Hawley et al., 1995), 3) en **protégeant la Thr172 phosphorylée de sa déphosphorylation** par des phosphatases (Davies et al., 1995).

-Il a récemment été décrit qu'en plus d'être un senseur des niveaux énergétiques de la cellule, l'AMPK est également un **senseur de la disponibilité en glucose**. En effet, en cas de faible concentration en glucose, les niveaux de l'intermédiaire de la voie glycolytique fructose-1,6-biphosphate (**FBP**, le produit de la catalyse par une enzyme étant une cible indirecte de l'AMPK, voir paragraphe stimulation des voies cataboliques) vont diminuer, ce qui provoque une cascade moléculaire résultant en l'activation de l'AMPK ancré à la surface des lysosomes (grâce à la N-myristoylation de sa sous-unité β) (*Figure 25*). En présence de glucose, des molécules de FBP se lient à l'aldolase (Aldo), qui interagit dans ce cas avec la pompe v-ATPase présente à la surface des lysosomes pour maintenir son activité, ce qui ne résulte ni au recrutement du complexe cytosolique AXIN-LKB1 au lysosome ni en l'activation de l'AMPK. En carence de glucose, les niveaux de FBP baissent et l'aldolase non occupée par FBP va interagir et inhiber le TRPV (transient receptor potential channel subfamily V) localisé à la membrane du RE. L'inhibition de l'activité du TRPV (efflux de Ca^{2+} du RE dans le cytosol) provoque une diminution de la concentration de Ca^{2+} au niveau des sites de contacts entre le RE et le lysosome, ce qui permet l'interaction entre le TRPV du RE et la v-ATPase du lysosome. Cette interaction provoque l'inhibition de la v-ATPase et le recrutement d'AXIN-LKB1 dans un complexe moléculaire à la surface du lysosome comprenant le complexe v-ATPase, Ragulator, AXIN, LKB1 et AMPK. C'est dans ce complexe que l'AMPK va être phospho-activé par LKB1, indépendamment des niveaux d'AMP (Li et al., 2019; Lin and Hardie, 2018; Zhang et al., 2017a).

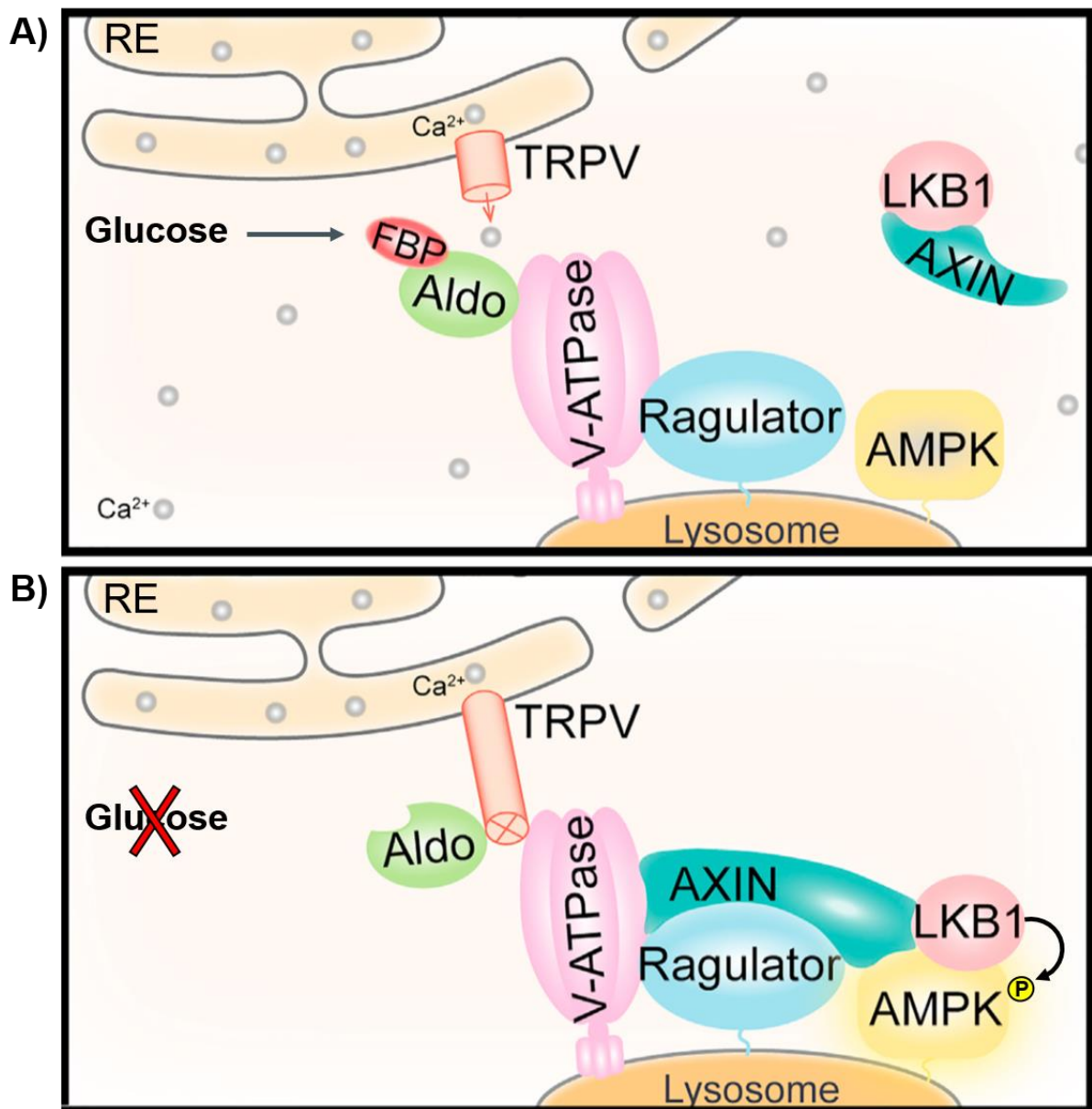


Figure 25 : Activation du complexe AMPK par la détection de la baisse des niveaux de fructose-1,6-biphosphate. Adapté de (Li et al., 2019).

-L'inhibition et le maintien de l'AMPK inhibé par la cellule dans les conditions ne nécessitant pas son activation ont été moins intensivement étudiés que les mécanismes menant à son activation. Néanmoins, environ **14 kinases** ont été identifiées comme pouvant physiologiquement phospho-inhiber l'AMPK en phosphorylant des résidus de la sous-unité α (Figure 26) (Ovens et al., 2021). Par exemple, l'inhibition de l'AMPK par l'insuline est dépendante de la phosphorylation de la Thr479 de la sous-unité α par la GSK3 (α et β), ce qui semble favoriser l'accès à la Thr172 par des phosphatases, et donc la déphosphorylation de ce résidu et l'inactivation de l'AMPK (Suzuki et al., 2013). De plus, comme évoqué un peu plus haut, la liaison de l'AMP empêche les phosphatases d'accéder à la pThr172 phosphorylée (Davies et al., 1995). Cependant, en l'absence de fixation d'AMP à l'AMPK, les phosphatases ont facilement accès à la pThr172 et peuvent alors maintenir l'AMPK dans un état Thr172-déphosphorylé inactif. Plusieurs phosphatases de l'AMPK ont été identifiées dont par exemple PP2A, PP2C (proteine phosphatase 2C), PP1 (proteine phosphatase 1) et PPM1E (Mg^{2+}/Mn^{2+} -dépendant protein phosphatase 1E) (Davies et al., 1995; Garcia-Haro et al., 2010; Joseph et al., 2015; Voss et al., 2011).

b) Modulations pharmacologiques de l'AMPK

-L'**AICAR** (5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleotide) est un nucléoside métaboliquement convertit par l'adénosine kinase en AICA ribotide (ZMP) qui va mimer l'action de l'AMP et ainsi activer l'AMPK (Sullivan et al., 1994). Bien que cette molécule soit l'une des plus utilisée pour stimuler l'activité de l'AMPK, il existe plusieurs rapports concluants cependant que plusieurs effets du traitement à l'AICAR attribués à l'activation de l'AMPK seraient en fait indépendants de l'AMPK (Višnjić et al., 2021).

-La **metformine (MET)**, ou 1,2-diméthylbiguanide est la molécule pharmacologique orale la plus prescrite contre le DT2. Dans cette pathologie, elle permet d'inhiber la néoglucogenèse hépatique, d'augmenter l'entrée du glucose dans les cellules musculaires et de réduire l'IR. La MET active l'AMPK indirectement en inhibant transitoirement le complexe I de la CRM, provoquant une chute de la production d'ATP et donc une augmentation du ratio ATP/AMP conduisant à l'activation de l'AMPK (Foretz et al., 2014). La MET s'accumule lentement dans les mitochondries (Bridges et al., 2014) et réduit la respiration de mitochondrie isolées (Andrzejewski et al., 2014) en inhibant l'activité de complexes I isolés, en interagissant et stabilisant la conformation inactive du complexe (Bridges et al., 2014). La MET semble également capable d'activer l'AMPK à la surface du lysosome par la voie de détection d'une chute de FBP, donc via LKB1, en promouvant la formation de complexes ν -ATPase-Ragulator-AXIN-LKB1-AMPK (Zhang et al., 2016) en provoquant des dégâts aux lysosomes, et en déclenchant une cascade moléculaire aboutissant à l'activation de l'AMPK par TAK1 à la surface des lysosomes endommagés (Jia et al., 2020).

-Le **salicylate** est une molécule extraite de l'écorce de saule et capable de se lier au site ADaM (allosteric drug and metabolite), entre le β -CBM et l' α -KD. Une autre molécule se fixant également sur le site ADaM est le composé artificiel A-769662, qui, comme le salicylate, active les complexes AMPK avec la sous-unité β_1 (Cool et al., 2006).

-Contrairement à l'existence de plusieurs molécules activatrices de l'AMPK, la dorsomorphine, ou **Compound C (CC)** (Zhou et al., 2001) a été la seule molécule décrite et largement utilisée comme inhibiteur de l'AMPK. Il a été d'abord décrit que le CC inhibe l'AMPK par compétition avec l'ATP en se fixant sur le site actif du domaine kinase (Handa et al., 2011). Cependant, il existe une controverse sur la spécificité du CC envers l'AMPK (Vogt et al., 2011). Il a récemment été rapporté qu'un autre compétiteur de l'ATP (**SBI-0206965**) était capable d'inhiber l'AMPK plus spécifiquement et plus fortement que le CC, d'un facteur de 40, sur un panel de 50 kinases (Dite et al., 2018). Enfin, un autre composé, le **MT47-100**, apparenté au A-769662, est aussi capable d'agir comme inhibiteur allostérique, mais seulement pour les complexes AMPK composés de la sous-unité β_2 (Scott et al., 2015).

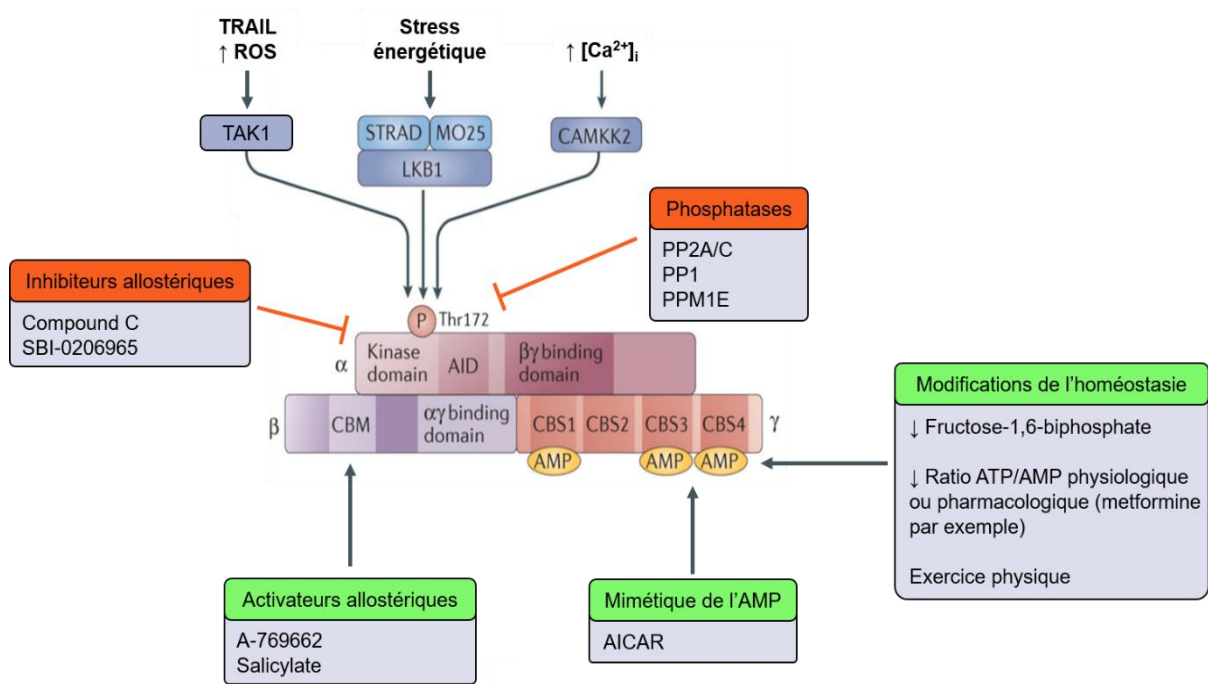


Figure 26 : La régulation de l'activité du complexe AMPK. Adapté de (Herzig and Shaw, 2018).

B) Régulation du métabolisme par l'AMPK

Une fois activé par un stress énergétique (baisse du ratio ATP/AMP), l'AMPK va moduler le métabolisme afin de rétablir l'homéostasie énergétique de la cellule. L'AMPK activé va à la fois **inhiber l'anabolisme** pour limiter la consommation d'ATP et **stimuler le catabolisme** afin d'augmenter la génération d'ATP (Figure 27).

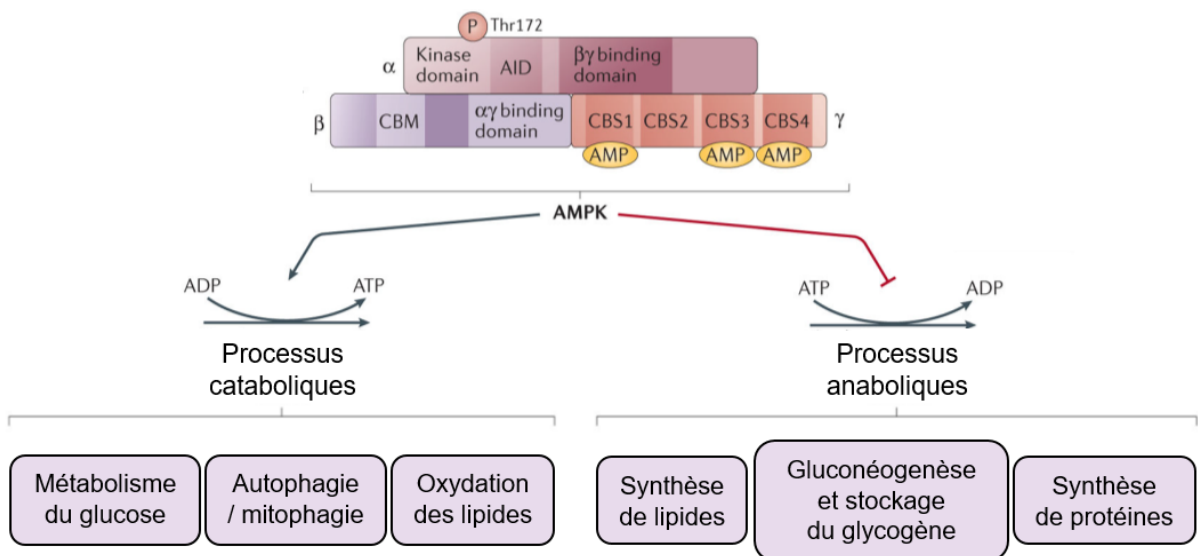


Figure 27 : Aperçu de la régulation du métabolisme de la cellule par l'AMPK. Adapté de (Herzig and Shaw, 2018).

1) Inhibition des voies anaboliques

Globalement, l'AMPK va **limiter la consommation d'ATP** dans la cellule en inhibant la synthèse de lipides, de protéines et l'anabolisme du glucose. L'AMPK activé va phospho-inhiber l'ACC1 (acetyl-CoA carboxylase 1) sur la Ser79 et l'ACC2 sur la Ser212, qui catalysent la première étape de la synthèse *de novo* des acides gras, et phospho-inhiber l'HMGCR (HMG-CoA reductase), qui catalyse l'étape limitante de la synthèse des cholestérols (Fullerton et al., 2013; Munday et al., 1988). L'AMPK contrôle aussi le métabolisme au niveau de la transcription en phosphorylant SREBP1 (sterol regulatory element-binding protein 1) sur la Ser372, ce qui bloque le clivage de sa forme précurseur, sa translocation nucléaire et la transcription d'enzymes lipogéniques cibles (Li et al., 2011). De plus, l'AMPK phospho-inhibe ChREBP (carbohydrate-responsive element binding protein) sur sa Ser568 (Kawaguchi et al., 2002), HNF4 α (hepatocyte nuclear factor 4 α) sur sa Ser304 (Hong et al., 2003), deux facteurs de transcription clés dans la régulation du métabolisme des acides gras et du glucose, respectivement, et phospho-inhibe le co-activateur transcriptionnel p300 sur la Ser89 (Yang et al., 2001), ce qui perturbe la réponse transcriptionnelle des NHR (nuclear hormone receptor). L'AMPK activé va également stopper le stockage du glycogène en phospho-inhibant la GYS1 et 2 (glycogen synthases 1 et 2) (Bultot et al., 2012), et stopper la biosynthèse des hexosamines et l'ajout de la MPT *O*-GlcNAc (*O*-linked β -*N*-acetylglucosamine) sur les protéines cellulaires, en phospho-inhibant la GFAT1 (Glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase 1) sur la Ser243, qui catalyse la première et limitante étape de l'entrée du glucose dans la synthèse des hexosamines (Eguchi et al., 2009). Concernant le métabolisme du glucose, l'AMPK bloque aussi la gluconéogenèse en phospho-inhibant CRTC2 (CREB regulated transcription coactivator 2), ce qui bloque sa translocation nucléaire et son rôle de co-activateur du facteur de transcription CREB (Koo et al., 2005). En plus, l'AMPK phospho-inhibe les HDAC4, 5 et 7 (histone deacetylase), bloquant ainsi leur translocation au noyau où elles permettent l'activation des facteurs de transcription de la famille FOXO (Mihaylova et al., 2011).

Enfin, l'AMPK activé stoppe la traduction et donc la biosynthèse protéique en inhibant d'une part mTORC1. Cette inhibition est causée par la phospho-activation de TSC2 (Tuberous Sclerosis Complex 2), un régulateur négatif de mTORC1 (Inoki et al., 2003) et par la phospho-inhibition de RAPTOR (Regulatory-associated protein of mTOR), une sous-unité du complexe mTORC1 (Gwinn et al., 2008). D'autre part, l'AMPK est capable de phospho-activer eEF2K (eukaryotic elongation factor 2 kinase), un régulateur négatif de la transcription et une cible que mTORC1 inhibe normalement quand ce dernier est actif (Leprivier et al., 2013). Enfin, l'AMPK actif est capable de diminuer la biogenèse des ribosomes en inhibant la transcription d'ARNr en perturbant la formation des complexes d'initiation de transcription Pol I au niveau des promoteurs des gènes codants l'ARNr, via la phosphorylation de TIF-IA (transcription initiation factor IA) en Ser635 (Cao et al., 2017; Hoppe et al., 2009).

2) Stimulation des voies cataboliques

De façon générale, l'AMPK va **promouvoir la ré-augmentation des stocks d'ATP** dans la cellule en stimulant le métabolisme du glucose, la mobilisation et l'oxydation des acides gras et la dégradation et recyclage de macromolécules et organites par autophagie/mitophagie. L'AMPK stimule le métabolisme du glucose, d'une part, en augmentant l'entrée du glucose dans la cellule. Pour cela, l'AMPK phospho-inhibe TXNIP (Thioredoxin-interacting protein) (Wu et al., 2013) et TBC1D1 (TBC1 domain family member 1) (Chavez et al., 2008), ce qui résulte en une augmentation de l'adressage à la membrane plasmique des transporteurs du glucose GLUT1 et GLUT4 respectivement, et donc en une augmentation de l'entrée du glucose. De plus, l'entrée de glucose par GLUT4 est également stimulée par la phospho-activation de PLD1 (phospholipase D1) sur la Ser505 par l'AMPK (Kim et al., 2010). Après l'entrée du glucose, l'AMPK peut stimuler sa glycolyse en phospho-activant la PFKFB3 (6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3), qui va stimuler l'activité de la PFK1 (phosphofructokinase 1), qui catalyse une étape limitante de la glycolyse (Marsin et al., 2002). Il est à souligner que la PFK1

catalyse une étape irréversible de la glycolyse qui aboutit à la génération de FBP et qu'en cas de chute de la concentration cellulaire en FBP, l'AMPK lysosomal est activé.

De plus, l'AMPK stimule aussi la mobilisation et l'oxydation des lipides stockés par la cellule en phospho-activant l'ATGL (adipose triglyceride lipase), libérant les acides gras de leurs formes de stockage que sont les triglycérides (Ahmadian et al., 2011). Ainsi, en phospho-inhibant l'ACC, et en phospho-activant l'ATGL, l'AMPK, favorise l'import des acides gras libres existant dans la mitochondrie et leur β -oxydation (Dagher et al., 2001; Ruderman et al., 2003) (Figure 28).

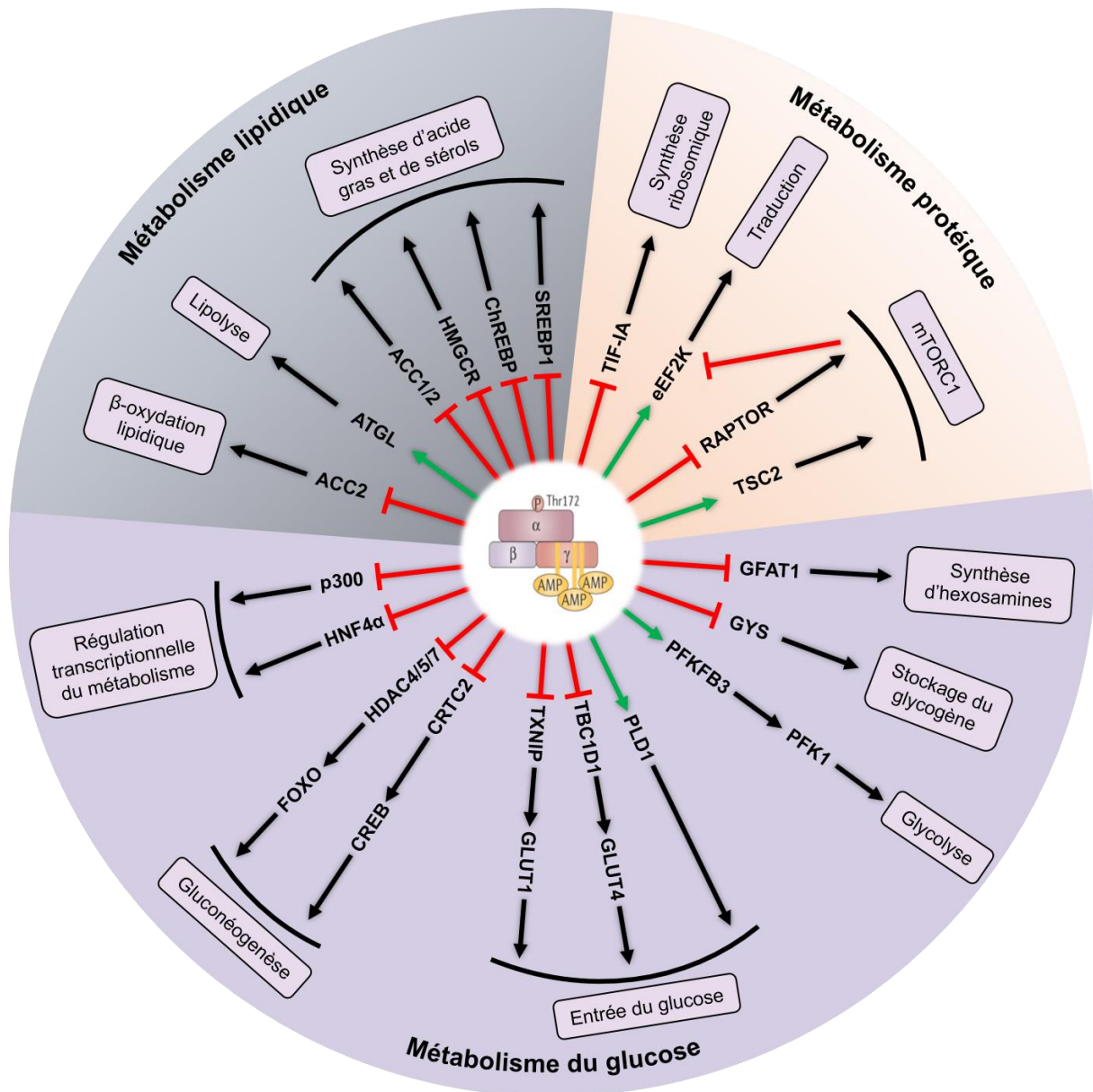


Figure 28 : La régulation du métabolisme par l'AMPK. Adapté de (Herzig and Shaw, 2018).

C) L'AMPK et les mitochondries

Outre son action sur les voies métaboliques, l'AMPK promeut la bonne santé des mitochondries, en étant capable de **stimuler leur biosynthèse**, leur **dynamique de fission/fusion** ainsi que leur turnover par **mitophagie** (Figure 29).

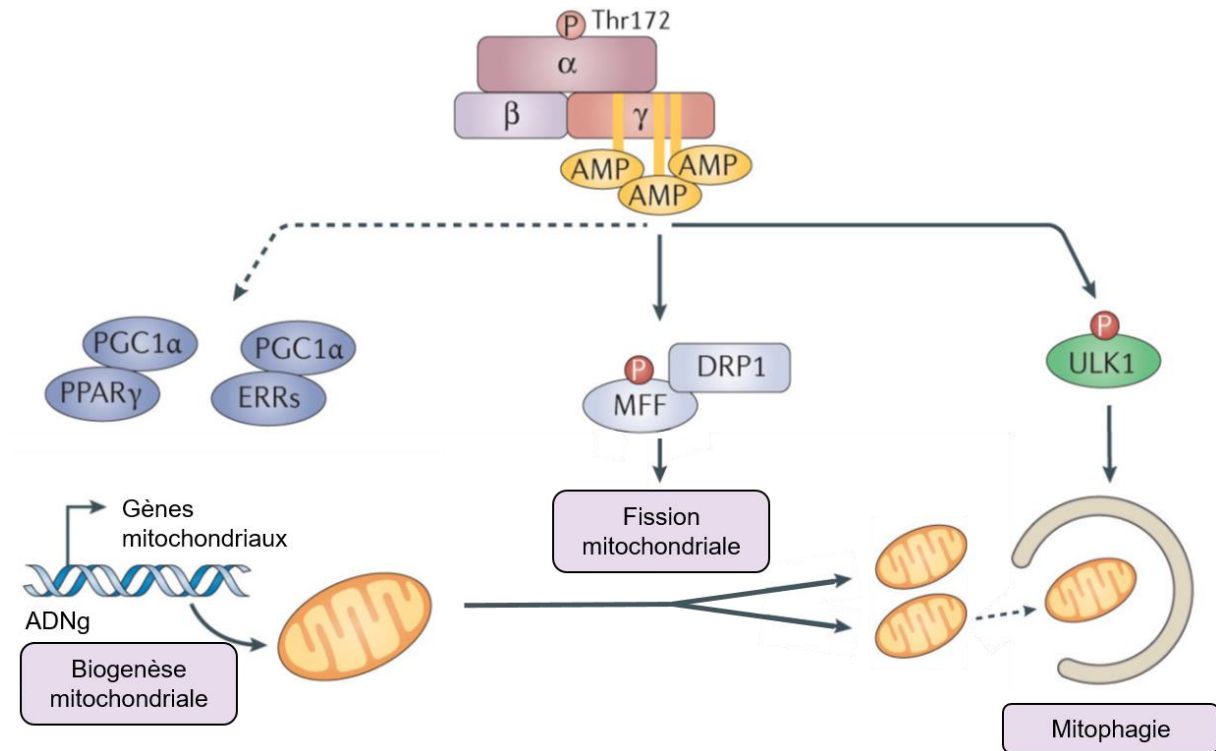


Figure 29 : La régulation de l'homéostasie mitochondriale par l'AMPK. Adapté de (Herzig and Shaw, 2018).

1) Stimulation de la biogenèse mitochondriale

L'activation chronique de l'AMPK est connue pour être capable de **stimuler la biosynthèse mitochondriale** dans les muscles (Bergeron et al., 2001). Justement, une des situations physiologiques où la cellule a besoin de dépenser plus d'énergie est lors de l'exercice physique (EP) (Durante et al., 2002; Frøsig et al., 2004). Ainsi, un traitement de souris sédentaires avec de l'AICAR pendant 4 semaines augmente leur consommation d'oxygène ainsi que leur endurance, sur un tapis de course, comparés aux souris sédentaires non traitées (Narkar et al., 2008). De même, la surexpression de l'AMPK constitutivement actif (sous-unité γ_3 (R225Q)) augmente la biogenèse mitochondriale dans les muscles de souris (Garcia-Roves et al., 2008). L'AMPK stimule la biogenèse en agissant directement ou indirectement sur l'activité de plusieurs facteurs de transcriptions nucléaires, dont la régulation transcriptionnelle de la plupart est sous le contrôle de PGC1 α qui interagit avec les ERRs (estrogen-related receptors) (Eichner and Giguère, 2011) et avec les facteurs de transcription PPAR α et γ (peroxisome proliferator-activated receptor) (Narkar et al., 2008). L'AMPK est justement capable de phospho-activer directement PGC1 α sur ses Thr177 et Ser538 (Jäger et al., 2007). De plus, l'AMPK phospho-activer le facteur de transcription TFEB (Paquette et al., 2021), capable d'activer la transcription de gènes comme PGC1 α et PPAR α en condition de carence (Settembre et al., 2013). Enfin, l'AMPK et PGC1 α sont capables, de manière synergétique, de stimuler l'activité d'un autre facteur de transcription, PPAR γ (Narkar et al., 2008).

2) Régulation de la dynamique mitochondriale

La stimulation de la fission par l'AMPK est dû à la phospho-activation de MFF sur les Ser155 et Ser173 (Ducommun et al., 2015; Toyama et al., 2016). MFF, présent à la MME, est le principal récepteur de la GTPase DRP1, et participe au recrutement de DRP1 cytosolique à la mitochondrie, où cette dernière va catalyser la fission de la mitochondrie (Losón et al., 2013). Ainsi, la phosphorylation de MFF par l'AMPK va provoquer une augmentation du recrutement de DRP1 à la MME et donc une **augmentation de la fission** (Toyama et al., 2016).

3) Régulation de la macroautophagie et mitophagie

En condition de stress induit par une carence en nutriments, l'autophagie peut être induite dans le but de générer une nouvelle source de nutriments pour entretenir le métabolisme de la cellule. Cette autophagie est caractérisée par un mécanisme d'initiation impliquant le complexe mTORC1 et est différente de celle dégradant les molécules et organites âgés ou endommagés (Kim et al., 2011). En condition d'abondance en nutriments, l'AMPK est inactif mais mTORC1, lui, est actif et phospho-inactive l'initiateur clé ULK1 sur la Ser757 (Kim et al., 2011), un partenaire de ULK1 (ATG13) (Puente et al., 2016) et ATG14, un membre du complexe PI3kinase de classe I initiant la formation du phagophore (Park et al., 2016). Mais en condition de carence, l'AMPK est activé et va stimuler l'autophagie de deux façons. D'abord **l'AMPK inhibe le complexe mTORC1** en phosphorylant TSC2 (Inoki et al., 2003) et RAPTOR (Gwinn et al., 2008), ce qui lève les inhibitions dues à mTORC1 (Kim et al., 2011). De plus, l'AMPK interagit avec ULK1 (Lee et al., 2010b) et **phospho-active ULK1** sur plusieurs résidus (Ser467, Ser555, Ser574 et Ser637) (Egan et al., 2011; Hoffman et al., 2015; Kim et al., 2011; Tian et al., 2015). Ainsi, active, ULK1 va phospho-activer plusieurs protéines impliquées dans l'autophagie, dont ses propres partenaires du complexe d'initiation ULK1 FIP200, ATG101 (Egan et al., 2015) et ATG13 (Joo et al., 2011) et des effecteurs comme ATG9 (Zhou et al., 2017), ATG14L159, VPS34 (vacuolar protein sorting 34) Bcl-1 et AMBRA1 (Egan et al., 2015; Russell et al., 2013). Grâce à cette modulation de l'activité d'ULK1, l'AMPK est donc capable d'influencer l'autophagie en condition de carence mais également d'influencer différents types de mitophagies dans lesquels ULK1 participe, comme la dégradation des mitochondries endommagées (Egan et al., 2011), dépolarisées (Joo et al., 2011), ou la dégradation des mitochondries surproduisant des ROSmit (Sinha et al., 2015).

L'AMPK a également un rôle (indirect) dans la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante via l'**activation d'une cible d'ULK1, TBK1**. TBK1 actif est recruté aux mitochondries endommagées et y active : 1) l'OPTN, par la phosphorylation de Ser473, ce qui augmente ses capacités à lier les chaînes d'Ub de la mitochondrie endommagée (Richter et al., 2016) ou en Ser177 pour permettre le bon recrutement du phagophore autour de la mitochondrie dépolarisée (Moore and Holzbaur, 2016), et 2) NDP52, permettant son recrutement à la mitochondrie endommagée (Heo et al., 2015) mais aussi en promouvant sa capacité à recruter le complexe FIP200/ULK1 permettant le recrutement du phagophore (Vargas et al., 2019). De plus, pSer172-TBK1 phosphoryle également p62 pour permettre son recrutement à la mitochondrie endommagée (Heo et al., 2015; Matsumoto et al., 2015). Un récent article a élégamment décrit la cinétique d'une mitophagie induite par un traitement au CCCP et l'importance de l'AMPK dans ce processus (Hung et al., 2021). Très rapidement après l'application du CCCP, l'AMPK s'active dans le cytosol (moins de 2 min), et phospho-active ULK1 qui va, à son tour, phosphoryler la Parkine cytosolique sur la Ser108. Cette phosphorylation semble requise pour qu'il y ait une phosphorylation rapide et maximale des Ser65 de Parkine par PINK1. L'AMPK et ULK1 vont être recrutés à la mitochondrie altérée, après une dizaine de minutes, où l'AMPK va phosphoryler MFF et stimuler la fission. Il faut attendre 30 à 60 min pour observer une stabilisation de PINK1, entraînant la phosphorylation de Parkine et des Ub des protéines de surface, ce qui est accompagné de l'activation de TBK1 et de l'activité de Parkine. Enfin, c'est après plus d'une heure de traitement que TBK1 va stimuler

le recrutement du complexe FIP200/ULK1 ce qui va permettre le recrutement du phagosome (Vargas et al., 2019).

Enfin, il est intéressant de noter qu'une boucle de rétrocontrôle négative existe, puisque l'activation de TBK1 par l'AMPK résulte en la phospho-inhibition de l'AMPK α_1 en Ser459 et Ser476 par TBK1 (Zhao et al., 2018) (Figure 30).

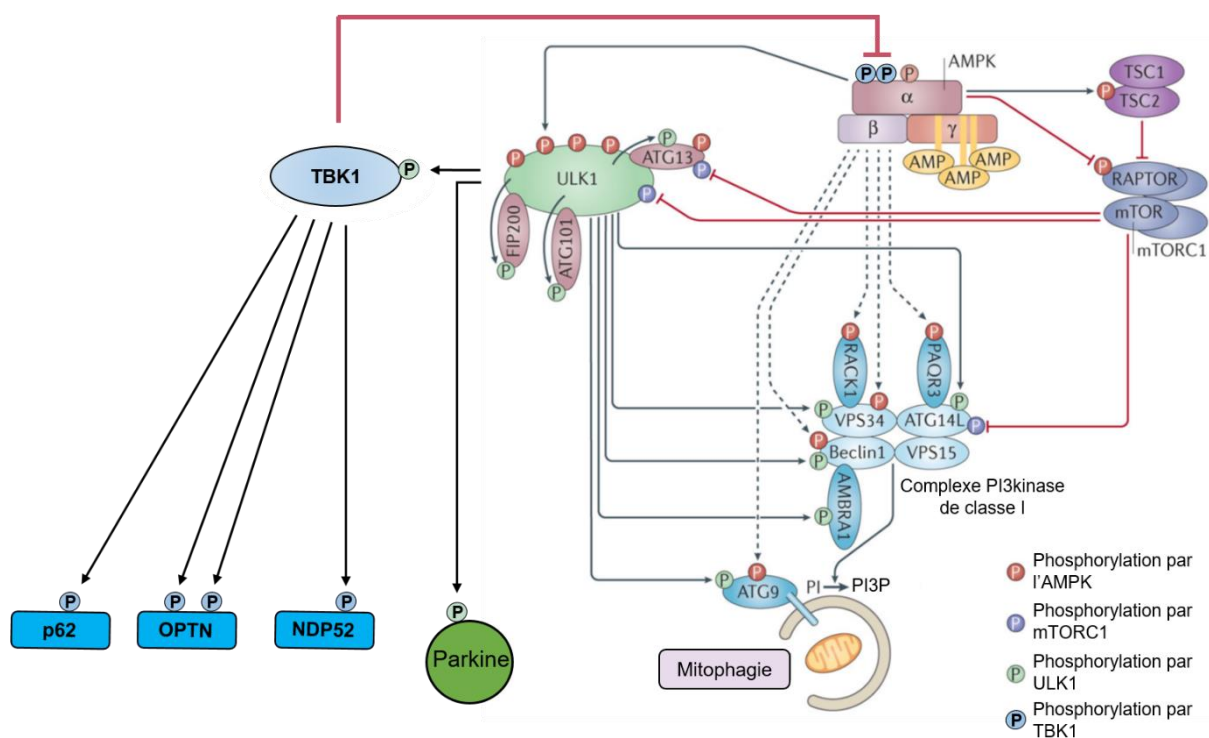


Figure 30 : La régulation de la mitophagie par l'AMPK. Adapté de (Herzig and Shaw, 2018).

D) Actions anti-inflammatoires de l'AMPK

En plus de ses rôles dans la régulation du métabolisme et du maintien de l'homéostasie des mitochondries, de plus en plus de données indiquent que l'AMPK agit de multiples façons sur la **signalisation inflammatoire** et sur le **métabolisme des cellules immunitaires**. Une fois encore, ces actions de l'AMPK sont protectrices car permettant de **réduire l'inflammation chronique délétère**.

1) Inhibition des cascades de signalisations pro-inflammatoires

L'AMPK inhibe trois différentes voies de signalisations pro-inflammatoires (Figure 31) :

1) Les cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et TNF- α activent en cascade la kinase IRAK4, puis MKK4 et enfin JNK. Dans les macrophages, l'AMPK inhibe la phosphorylation activatrice de la JNK (c-Jun N-terminal kinase) (Jeong et al., 2009). Il a par la suite été démontré qu'après stimulation, l'AMPK inhibait la phosphorylation activatrice de IRAK4 (interleukin-1 receptor associated kinase-4) et la phosphorylation activatrice de MKK4 (MAPK Kinase 4) (Mancini et al., 2017).

2) Dans les macrophages et dans des lignées de cellules macrophagiques, l'AMPK est capable d'inhiber la dégradation d'I κ B α et de réduire la fixation de NF κ B (nuclear factor- κ B) p65 sur sa séquence consensus (Sag et al., 2008; Yang et al., 2010). Dans les cellules endothéliales, l'AMPK phosphoryle le co-activateur transcriptionnel p300, qui ne va plus acétyler NF κ B p65, ce qui va inhiber son recrutement aux promoteurs de ses gènes cibles (Zhang et al., 2011). Une autre étude a décrit que l'activation de l'AMPK inhibe la transduction du signal pro-inflammatoire par hyperphosphorylation d'IKK (I κ B kinase) (Bess et al., 2011). Dans les adipocytes cependant, l'inhibition de la voie NF κ B est plutôt dû à une inhibition de la phosphorylation et de l'activité d'IKK (Mancini et al., 2017).

3) L'AMPK, après traitement avec des activateurs (A769662, salicylate et MET) phosphoryle rapidement et directement une des quatre tyrosine kinases de la famille des JAK, JAK1 sur ses Ser515 et Ser518 (Rutherford et al., 2016). JAK1 ainsi phosphorylé se lie fortement à la protéine 14-3-3 ζ , perturbant la phosphorylation des cibles de JAK1, STAT1 et STAT3 et la transmission du signal induit par sIL-6R α /IL-6.

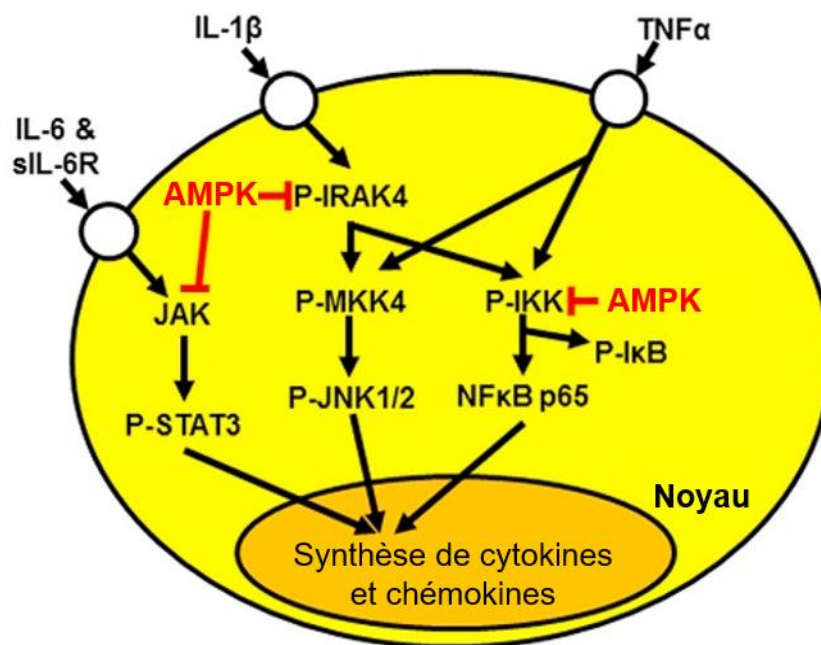


Figure 31 : Inhibition de cascades de signalisations pro-inflammatoires par l'AMPK. Adapté de (Mancini et al., 2017).

2) Modulation du métabolisme et de la différenciation des cellules immunitaires

De manière intéressante, l'AMPK semble aussi capable d'exercer un effet anti-inflammatoire en faisant **basculer le métabolisme des cellules immunitaires** de la glycolyse vers l'oxydation mitochondriale, notamment des acides gras (O'Neill and Hardie, 2013).

Dans des cellules dendritiques murines de la moelle osseuse, l'application de LPS (lipopolysaccharide) provoque une chute de la forme pThr172-AMPK et une élévation des niveaux de l'IL-12p40 et CD86, amplifiée par les shRNA AMPK α_1 ou AMPK α_2 et, au contraire, réduite par l'AICAR (Krawczyk et al., 2010). De plus, il a été rapporté que la glycolyse est plus importante dans les cellules T (au repos) de souris AMPK $\alpha_1^{-/-}$ (MacIver et al., 2011) et que les cellules T CD8 $^{+}$ AMPK $\alpha_1^{-/-}$ produisent plus de cytokines pro-inflammatoires (l'IL-17 et IFN- γ). Enfin, la transition d'un macrophage pro-inflammatoire M1 en un macrophage anti-inflammatoire M2 dépend de l'AMPK et de l'OAG (Galic et

al., 2011). L'activation de l'AMPK β 1 par la molécule A-769662 dans les macrophages, provoque une augmentation de la phosphorylation de l'ACC et de l'OAG, ainsi qu'une diminution de la phosphorylation de JNK, marqueur de l'activation M1. L'inverse, la déplétion génétique de la sous-unité β 1 conduit à une baisse de l'activation de l'ACC et une inhibition de l'OAG et à une augmentation de l'accumulation de lipides et de l'inflammation. L'AMPK β 1 est donc aussi essentiel pour prévenir de l'inflammation induite par les lipides, par stimulation de l'OAG. De plus, la transplantation de moelle osseuse AMPK β 1^{-/-} chez des souris WT (wild type) provoque une inflammation systémique, des macrophages des tissus adipeux et une inflammation hépatique conduisant à une résistance à l'insuline. L'AMPK est donc également essentiel pour modérer l'inflammation des tissus adipeux. De plus, l'activation de cellules T CD4⁺ de personnes âgées induit un excès de cytokines (IL-6, IL-17A, IL-17F, IL-21 et IL-23) produites par un sous-type de cellules T pro-inflammatoires, les Th17 (Bharath et al., 2020). L'activation de l'AMPK par la MET a permis de réduire cette production de cytokines inflammatoire à des niveaux observés dans les cellules de patients plus jeunes. Cette action passe par la stimulation de l'activité autophagique et mitophagique, qui est moins active dans les cellules T CD4⁺ âgées, et dont la stimulation permet de réduire les niveaux de ROSmit et les niveaux de STAT3 activé (pThr705-STAT3), un régulateur transcriptionnel clé pour la différenciation en Th17 (Wei et al., 2008). De plus, il existe parmi les cellules T CD4⁺ deux profils métaboliques différents : les cellules T effectrices (Teff) pro-inflammatoires (Th1, Th2 et Th17) avec un métabolisme glycolytique et mTOR actif alors que les cellules T régulatrices (Treg) anti-inflammatoires ont des niveaux d'AMPK actif élevés et un métabolisme dépendant de la β -oxydation des lipides (Michalek et al., 2011). Ainsi, l'activation de l'AMPK dans des cellules T CD4⁺ murines avec la MET, oriente leur différenciation vers un type anti-inflammatoire (Treg) plutôt que pro-inflammatoire (Teff), via la stimulation de l'OAG (Michalek et al., 2011). A l'inverse, la déplétion d'AMPK α 1 dans des cellules dendritiques et macrophages de souris augmente leur production de cytokines pro-inflammatoires (IL-6 et TNF- α) mais diminue celle de l'anti-inflammatoire IL-10 suite à un traitement au LPS (Carroll et al., 2013). Cette perte d'AMPK α 1 a également eu pour effet une augmentation de l'activité de présentation d'antigènes et une augmentation de la réponse inflammatoire Th1 et Th17, produisant de l'IL-17 et de l'IFN- γ .

3) Modulation de la neuro-inflammation

Dans le CNS, l'AMPK est majoritairement exprimé par les neurones, mais l'est également par les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies (Ramamurthy and Ronnett, 2006). Plusieurs études rapportent que la réaction pro-inflammatoire induite par le LPS dans des cultures primaires de microglies ou dans la lignée de microglies murines BV2 est associée avec une réduction de pThr172-AMPK (Li et al., 2018; Xu et al., 2015). A l'inverse, la stimulation de l'AMPK permet de favoriser la polarisation des microglies induite par le LPS en type M2 anti-inflammatoire plutôt que M1 pro-inflammatoire (Li et al., 2018; Xu et al., 2015). En effet, l'activation de l'AMPK (avec l'AICAR) est capable d'inhiber l'expression des gènes pro-inflammatoires (CCL2, TNF- α et CXCL10) induite par l'IFN- γ dans des astrocytes et microglies primaires, via l'inhibition de la translocation nucléaire du facteur de transcription STAT1 (Meares et al., 2013). A l'inverse, la déplétion de deux sous-unités AMPK α dans les cultures d'astrocytes primaires résulte en l'augmentation des niveaux de STAT1 et de ces mêmes cibles pro-inflammatoires. Dans la lignée BV2, l'activation de l'AMPK (traitement à l'AICAR ou à l'ENERGI-F704) réduit la production de cytokines pro-inflammatoires induites par le LPS (IL-6 et TNF- α) (Chen et al., 2014a). De plus, cette activation de l'AMPK a aussi pu réduire la concentration d'oxyde nitrique (NO) et l'expression de iNOS (inducible nitric oxide synthase) induite par le LPS. IL-6, TNF α et iNOS sont induits par la signalisation NF κ B et justement, l'activation de l'AMPK permet de réduire les niveaux de NF κ B p65 et sa translocation nucléaire, un effet bloqué avec le CC (Chen et al., 2014a). Suite à une injection IP de LPS, la neuro-inflammation rétinale a également pu être réduite par traitement à l'AICAR, avec une réduction des niveaux de transcrits de TNF- α et une baisse de l'expression du GFAP (Kamoshita et al., 2016).

Que ce soit dans des cultures de microglies *in vitro* ou dans des cerveaux l'activation pharmacologique de l'AMPK est capable de **bloquer la réaction de neuro-inflammation** dû à différents stimuli inflammatoires (LPS, IFN- γ) et ce blocage est contrecarré par l'inhibition de l'AMPK (génétique ou pharmacologique). Tous ces résultats indiquent donc que l'AMPK actif favorise la réaction anti-inflammatoire au détriment de la réaction pro-inflammatoire.

PROJET DE THÈSE

L'hypothèse de la cascade amyloïde identifie le peptide A β comme l'agent causatif de la MA. Néanmoins, plusieurs études de la littérature, dont certaines de mon laboratoire d'accueil, éclairent sur le fait que certaines modifications pathologiques de la MA sont détectables avant le développement de la pathologie amyloïde. Cela est notamment le cas des dysfonctions endolysosomales, causées par l'accumulation précoce des APP-CTFs dans ces structures. Cela suggère donc qu'avant et indépendamment du développement de la pathologie amyloïde et Tau, les fragments APP-CTFs sont de nouveaux acteurs de la MA possédant un pouvoir toxique. De manière intéressante, la structure et le fonctionnement des mitochondries ont aussi été décrits comme présentant des altérations de manière précoce dans la MA, mais jusqu'à présent, ces défauts étaient majoritairement attribués à la toxicité du peptide A β .

L'hypothèse de mon premier travail de thèse a donc été que, dans la MA, indépendamment de l'A β , l'accumulation précoce des APP-CTFs cause également une pathologie mitochondriale, suggérant, de fait, que l'accumulation des APP-CTFs et la pathologie mitochondriale pourraient constituer des cibles thérapeutiques contre la MA. Les dysfonctions mitochondriales et mitophagiques précoces pourraient être contrecarrées via la modulation de la voie de signalisation AMPK-ULK1, qui contrôle l'homéostasie mitochondriale, en stimulant la mitophagie. De plus, étant donné la multitude de processus dépendants du bon fonctionnement des mitochondries, il est attendu que l'amélioration de l'homéostasie mitochondriale ait des conséquences bénéfiques sur bien d'autres aspects de la maladie. Ainsi, lors de ma thèse, j'ai poursuivi mon projet en étudiant l'implication potentielle de la cascade de signalisation AMPK-ULK1 dans le développement de la MA et l'impact de sa stimulation sur plusieurs paradigmes de la MA.

Les différents objectifs de mon projet ont été de :

- 1) Déterminer l'impact spécifique de l'accumulation des APP-CTFs sur la structure et les fonctions des mitochondries dans des modèles de la MA cellulaires et chez des souris modèles de la MA.
- 2) Déterminer l'impact spécifique de l'accumulation des APP-CTFs sur la mitophagie dans des modèles de la MA cellulaires et chez des souris modèles de la MA ainsi que dans des nécropsies de cerveaux de patients atteints de la MA.
- 3) Etudier l'état de la signalisation AMPK-ULK1 dans différents modèles cellulaires et murins de la MA, ainsi que dans des nécropsies de cerveaux de patients Alzheimer sporadiques.
- 4) Déterminer les impacts de la modulation pharmacologique et génétique de la signalisation AMPK-ULK1 sur la structure et le fonctionnement des mitochondries, la mitophagie, mais aussi la pathologie amyloïde et Tau, l'inflammation, la maturation des épines dendritiques et la cognition dans des modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo* d'étude de la MA.

MODÈLES ET TECHNIQUES D'ÉTUDE

MODELES D'ETUDES

A) In vitro

Lors de ma thèse, j'ai eu recours à plusieurs modèles cellulaires. Le plus utilisé a été les cellules de neuroblastome humains SH-SY5Y surexprimant de façon stable l'APP humain avec la double mutation suédoise (KM670/671NL) (SH-SY5Y-APP^{swe}). Par rapport aux cellules contrôles, les cellules SH-SY5Y-APP^{swe} expriment donc plus d'APP et produisent différents fragments issus du clivage de l'APP, notamment les fragments APP-CTFs et les peptides A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂. Afin d'étudier l'impact spécifique des APP-CTFs, des modèles surexprimant le fragment C99 ont aussi été utilisés. Il s'agissait de cellules SH-SY5Y exprimant de façon stable et inductible le C99, ou bien des cellules HEK exprimant de façon transitoire le fragment C99. Afin de potentialiser l'accumulation des APP-CTFs et, surtout, bloquer celle de l'A β , ces modèles d'études cellulaires ont été traités avec un inhibiteur de la γ -sécrétase. Afin de consolider les résultats obtenus avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase, j'ai également utilisé un inhibiteur de la β -sécrétase bloquant l'accumulation de l'A β et du C99 et augmentant celle du C83. Enfin, pour s'assurer de la spécificité de l'inhibiteur de la γ -sécrétase envers le substrat APP, des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) isolés de souris KO pour l'APP et APLP2 ont été utilisés. L'utilisation de ce modèle nous a permis d'une part d'évaluer l'impact de la délétion de l'APP endogène et de vérifier la spécificité de l'inhibiteur de la γ -sécrétase. Les cellules SH-SY5Y-APP^{swe} ont également été traitées avec un activateur de l'AMPK (la metformine : MET) ou un inhibiteur de l'AMPK (compound C : CC), et ont aussi été infectées avec des lentivirus pour pouvoir surexprimer des formes constitutive-active (CA) ou dominante-négative (DN) de l'AMPK α_2 .

B) Ex vivo

Mon laboratoire a récemment mis au point un modèle d'étude de culture de coupes organotypiques d'hippocampes de souris permettant d'étudier la maturation des épines dendritiques et ceci dans un contexte intégré de l'hippocampe conservant sa composition et sa structure. Cette culture autorise, à la fois l'infection des neurones par des lentivirus d'intérêts permettant l'expression d'APP^{swe} ou d'AMPK α_2 (formes constitutive-active ou dominante-négative), mais également le traitement avec des agents pharmacologiques (MET ou CC).

C) In vivo

Le modèle d'étude préclinique de choix de ma thèse a été celui des souris triple transgéniques 3xTgAD (APP^{swe}, TauP301L et PS1 (M146V)). Ces souris surexpriment les transgènes humains codants l'APP avec la mutation familiale suédoise (APP^{swe}) et la protéine Tau avec la mutation P301L (une mutation familiale de la DFT), sous le contrôle du promoteur neuronal murin Thy1.2. Ces souris expriment aussi à un niveau endogène *PS1* avec le KI de la mutation familiale M146V. Ces souris ont l'avantage de présenter à la fois une pathologie amyloïde, Tau, des défauts synaptiques, une neuroinflammation et des atteintes cognitives, qui apparaissent de manière séquentielle sur plusieurs mois, à l'instar des pathologies chez les patients Alzheimer. De manière intéressante, les souris 3xTgAD accumulent les

APP-CTFs plus précocement que l'A β , événement qui est accompagné de dysfonctions endolysosomales et d'un comportement apathique.

Mon laboratoire d'accueil a également développé un modèle de souris double transgéniques 2xTgAD (APP^{swe} et TauP301L). A la différence des 3xTgAD, elles expriment une PS1 endogène non mutée. Cela a pour conséquence une accumulation des APP-CTFs similaire à celle des 3xTgAD, mais les 2xTgAD ne présentent pas d'accumulation d'A β détectable, ni d'hyperphosphorylation de Tau, même à des âges avancés (20 mois). Ainsi, la comparaison entre les souris double et triple transgéniques permet d'étudier l'impact de l'accumulation des APP-CTFs indépendamment des pathologies amyloïdes et Tau. Enfin, pour étudier plus particulièrement l'impact spécifique de l'APP-CTF C99, mon laboratoire a développé le modèle de souris dites « AAV-C99 », obtenues par l'injection intraventriculaire de souris WT (C57BL6) âgées de 1 jour, d'AAV10 permettant l'expression du fragment C99 humain sous le contrôle du promoteur neuronal synapsine-1.

Chez les souris 3xTgAD et AAV-C99 le traitement avec un inhibiteur de la γ -sécrétase, par gavage oral a été effectué dans le but d'inhiber la production de l'A β et d'augmenter l'accumulation du C99 et du C83. Chez les souris 3xTgAD enfin, la signalisation impliquant l'AMPK a été stimulée par un traitement avec de la MET dans leur eau de boisson.

TECHNIQUES D'ETUDES

Les niveaux protéiques ont été évalués dans les extraits protéiques de cellules ou de souris, avec ou sans enrichissement de la fraction mitochondriale, par western-blotting. Les concentrations d'A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ ont été déterminées par ELISA. La localisation des protéines et les analyses de colocalisation de signaux et d'intensité de signaux fluorescents ont été obtenues par des expériences d'immunofluorescences, en transfectant des sondes et/ou en utilisant des anticorps spécifiques puis par imagerie au microscope. Ainsi, la mitophagie a pu être analysée par analyse des niveaux de protéines dans les fractions mitochondriales, ainsi que par l'analyse de la colocalisation entre des signaux mitochondriaux et lysosomaux, LC3, ou Parkine. De plus, la sonde Cox8-EGFP-mCherry a aussi permis d'évaluer la proportion de mitochondries dans les mitolysosomes. Cette variété d'approches m'a permis de suivre les différentes étapes de la mitophagie (initiation, recrutement du phagophore, fusion du mitophagosome avec le lysosome et dégradation des protéines mitochondriales). La structure des mitochondries des cellules ou dans le corps cellulaire des neurones du subiculum des souris a nécessité la prise de clichés de ces mitochondries par microscopie électronique en transmission. L'analyse de ces clichés permet également d'analyser d'autres structures, comme les lysosomes et les vésicules autophagiques. Les fonctions mitochondriales ont été évaluées par l'utilisation des sondes mesurant le $\Delta\Psi$ mit (TMRM) et les ROSmit (MitoSOX) et en mesurant l'intensité du signal de ces deux sondes au cytomètre de flux. L'analyse de la maturation des épines dendritiques s'est faite par imagerie de ces épines au microscope confocal et quantification des images ainsi obtenues. L'inflammation a été évaluée par des approches d'immunofluorescence, révélant le nombre, la morphologie des cellules gliales et leur recrutement autour des plaques amyloïdes, et par une approche V-Plex permettant de quantifier les cytokines pro- et anti-inflammatoires.

L'activité locomotrice spontanée des souris, dont leur redressement, a été mesurée durant deux nuits successives dans des cages actimétriques. L'appréciation des capacités d'apprentissage et de mémorisation spatiale des souris WT et 3xTgAD s'est faite via deux tests différents. Le premier a été le test de la piscine de Morris, durant lequel les souris apprennent durant cinq jours la position d'une plateforme immergée en nageant jusqu'à cette dernière grâce à des indices visuels sur les murs. La mémoire des souris a été ensuite testée un jour plus tard, lors d'un test où la plateforme a été retirée en

présence des indices muraux. Un deuxième test de mémoire spatiale à également été utilisé avec un stimulus aversif moins intense : le test de Barnes. Ce test présente l'avantage que l'apprentissage des souris ne se fait pas dans l'eau, et qu'il est donc dépourvu du potentiel facteur confondant dû à la très stressante nage forcée de la piscine de Morris. En effet, dans le test de Barnes, les souris sont placées au centre d'une table éclairée, avec 20 trous en bordure, dont un seul avec une cage dessous, pour pouvoir s'y abriter. Les souris ont quatre jours d'apprentissage pour apprendre le chemin vers ce trou échappatoire, encore une fois, grâce à la présence d'indices muraux, et ont leur mémoire testée un puis quatre jours plus tard, après retrait de la cage sous le trou à atteindre.

RESULTATS PARTIE I

Article 1 : « L'accumulation des fragments C-terminaux de l'APP impacte la structure et les fonctions mitochondriales et la mitophagie dans des modèles de la MA et des cerveaux de patients. »

Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy effects in Alzheimer's disease models and human brains.

Loan Vaillant-Beuchot*, **Arnaud Mary***, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Alexandre Bourgeois, Inger Lauritzen, Fanny Eysert, Paula Fernanda Kinoshita, Julie Cazareth, Céline Badot, Konstantina Fragaki, Renaud Bussiere, Cécile Martin, Rosanna Mary, Charlotte Bauer, Sophie Pagnotta, Véronique Paquis-Flucklinger, Valérie Buee-Scherrer, Luc Buée, Sandra Lacas-Gervais, Frédéric Checler, Mounia Chami.

(* co-premiers auteurs)

Acta Neuropathologica

Received: 9 June 2020 / Revised: 3 September 2020 / Accepted: 1 October 2020.

<https://doi.org/10.1007/s00401-020-02234-7>

Résumé des résultats

Dans cet article, nous rapportons que les fragments APP-CTFs (C99 et C83) s'accumulent dans la mitochondrie dans différents modèles d'étude de la MA *in vitro*, et *in vivo* et dans les cerveaux de patients Alzheimer sporadiques. Des analyses biochimiques et fonctionnelles nous ont permis de démontrer l'implication des APP-CTFs, indépendamment de l'A β , dans l'altération de la structure mitochondriale, les dysfonctions mitochondriales et le défaut de la mitophagie.

In vitro, les cellules SH-SY5Y-APP^{swe}, accumulant les APP-CTFs et l'A β dans la fraction mitochondriale, présentent une altération de la structure des mitochondries avec une désorganisation de leurs crêtes, une baisse des niveaux de la sous-unité NDUF8B (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B8) du complexe I, de son activité, ainsi qu'une augmentation de la production de ROS_{mit}. De plus, des dysfonctions mitochondriales sont aussi présentes dans les cellules SH-SY5Y exprimant le fragment C99. Le traitement des SH-SY5Y-APP^{swe} avec un inhibiteur de la γ -sécrétase, bloquant la production de l'A β au profit de l'accumulation des APP-CTFs, nous a permis de démontrer que l'accumulation des APP-CTFs est impliquée dans les défauts de structures et de fonctionnements des mitochondries, indépendamment de l'A β . A l'inverse, le traitement des SH-SY5Y-APP^{swe} avec un inhibiteur de la β -sécrétase, bloquant la production de C99 et de l'A β , permet de bloquer certaines altérations morphologiques et fonctionnelles des mitochondries. Nous avons également rapporté que l'accumulation des APP-CTFs est associée à des défauts de structures des mitochondries *in vivo* chez : i) les souris transgéniques 3xTgAD jeunes accumulant les fragments APP-CTFs en l'absence de niveaux détectables d'A β intracellulaires et n'ayant pas développé de plaques amyloïdes, traitées ou non avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase ; et ii) les souris AAV-C99 jeunes et âgées injectées avec des AAV-C99 sous le contrôle d'un promoteur neuronal. La corrélation de l'accumulation des APP-CTFs avec l'altération de la structure mitochondriale a été formellement démontrée chez des souris transgéniques 3xTgAD âgées accumulant l'A β et les APP-CTFs et des souris 2xTgAD âgées accumulant les APP-CTFs en l'absence de l'A β .

L'étude de ces modèles *in vitro* et *in vivo* nous a permis de démontrer pour la première fois, qu'indépendamment de l'A β , l'accumulation des APP-CTFs provoque une activation de la mitophagie (augmentation de PINK1, Parkine et de LC3-II/I mitochondriaux) suivie par une perturbation du processus en aval, notamment par une inhibition de la fusion des mitophagosomes avec les lysosomes. Cela résulte en l'accumulation de mitochondries structurellement et fonctionnellement altérées dans nos modèles d'étude. L'analyse comparative des souris 2xTgAD et 3xTgAD âgées a néanmoins permis de révéler un rôle de l'A β dans l'exacerbation de la mitophagie chez les souris âgées. De façon intéressante, l'analyse de la mitophagie dans le cerveau de patients sporadiques, principalement à des stades de Braak avancés renforce ce constat d'un défaut mitophagique à plusieurs étapes du processus. Nous avons observé dans les fractions enrichies en mitochondries des cerveaux de malades Alzheimer sporadiques une accumulation des APP-CTFs associée à une augmentation du ratio LC3-II/I et de p62. L'initiation de la mitophagie est également défectueuse chez les patients Alzheimer, car les niveaux protéiques de PINK1 et Parkine sont tous les deux réduits dans cette fraction mitochondriale. De plus, nous avons étudié la participation de plusieurs acteurs de la MA et rapporté que l'accumulation du fragment C99 corrèle de façon significative avec les variations pathologiques des différents marqueurs mitophagiques testés (PINK1, Parkine, LC3-II/I et p62), alors que l'A β et pTau ne corrèlent, respectivement, qu'avec Parkine et LC3II/I. Ces résultats démontrent bien l'impact prépondérant du C99 versus A β et Tau dans le phénotype mitophagique défectueux.

L'ensemble de nos résultats démontre l'importance des dysfonctions mitochondriales et mitophagiques dans la pathogenèse de la MA, et suggère qu'un bon moyen d'y remédier pourrait être de cibler l'accumulation précoce des APP-CTFs et/ou d'identifier la cascade moléculaire contrôlant le défaut de la mitophagie dans le contexte de la MA.



Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains

Loan Vaillant-Beuchot¹ · Arnaud Mary¹ · Raphaëlle Pardossi-Piquard¹ · Alexandre Bourgeois¹ · Inger Lauritzen¹ · Fanny Eysert¹ · Paula Fernanda Kinoshita^{1,2} · Julie Cazareth¹ · Céline Badot¹ · Konstantina Fragaki³ · Renaud Bussiere^{1,4} · Cécile Martin¹ · Rosanna Mary¹ · Charlotte Bauer¹ · Sophie Pagnotta⁵ · Véronique Paquis-Flucklinger³ · Valérie Buée-Scherrer^{6,7} · Luc Buée^{6,7} · Sandra Lacas-Gervais⁵ · Frédéric Checler¹ · Mounia Chami¹

Received: 9 June 2020 / Revised: 3 September 2020 / Accepted: 1 October 2020 / Published online: 20 October 2020
© The Author(s) 2020

Abstract

Several lines of recent evidence indicate that the amyloid precursor protein-derived C-terminal fragments (APP-CTFs) could correspond to an etiological trigger of Alzheimer's disease (AD) pathology. Altered mitochondrial homeostasis is considered an early event in AD development. However, the specific contribution of APP-CTFs to mitochondrial structure, function, and mitophagy defects remains to be established. Here, we demonstrate in neuroblastoma SH-SY5Y cells expressing either APP Swedish mutations, or the β -secretase-derived APP-CTF fragment (C99) combined with β - and γ -secretase inhibition, that APP-CTFs accumulation independently of A β triggers excessive mitochondrial morphology alteration (i.e., size alteration and cristae disorganization) associated with enhanced mitochondrial reactive oxygen species production. APP-CTFs accumulation also elicit basal mitophagy failure illustrated by enhanced conversion of LC3, accumulation of LC3-I and/or LC3-II, non-degradation of SQSTM1/p62, inconsistent Parkin and PINK1 recruitment to mitochondria, enhanced levels of membrane and matrix mitochondrial proteins, and deficient fusion of mitochondria with lysosomes. We confirm the contribution of APP-CTFs accumulation to morphological mitochondria alteration and impaired basal mitophagy in vivo in young 3xTgAD transgenic mice treated with γ -secretase inhibitor as well as in adeno-associated-virus-C99 injected mice. Comparison of aged 2xTgAD and 3xTgAD mice indicates that, besides APP-CTFs, an additional contribution of A β to late-stage mitophagy activation occurs. Importantly, we report on mitochondrial accumulation of APP-CTFs in human post-mortem sporadic AD brains correlating with mitophagy failure molecular signature. Since defective mitochondria homeostasis plays a pivotal role in AD pathogenesis, targeting mitochondrial dysfunctions and/or mitophagy by counteracting early APP-CTFs accumulation may represent relevant therapeutic interventions in AD.

Keywords Alzheimer's disease · Amyloid precursor protein · Amyloid beta · APP-CTFs · C99 · C83 · Mitochondria · Mitophagy

Vaillant-Beuchot Loan and Mary Arnaud have contributed equally to this work.

Checler Frédéric and Chami Mounia share co-senior authorship.

Electronic supplementary material The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00401-020-02234-7>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Mounia Chami
mchami@ipmc.cnrs.fr

Extended author information available on the last page of the article

Introduction

Neurons, as post-mitotic and high-energy demanding cells, are especially sensitive to impairment of mitochondria functions and defective quality control processes. Mitochondria provide most of the cell energetic demands by generating ATP, the product of the oxidative phosphorylation (OXPHOS). Along with cell life control, mitochondria are also implicated in harmful reactive oxygen species (ROS) production and apoptotic cell death [57]. Mitochondria homeostasis is governed by equilibrium between genesis and

clearance by mitophagy, the selective degradation process of defective or functionally altered mitochondria [64]. One major mechanism of mitophagy is the PTEN (Phosphatase and TENsin homolog)-induced putative kinase 1 (PINK1)/Parkin pathway. Unhealthy mitochondria with a loss of membrane potential ($\Delta\Psi_m$) stabilize PINK1 at the outer mitochondrial membrane. PINK1 recruits the E3 Ubiquitin ligase Parkin to generate polyubiquitinated proteins recognized by mitophagy adapters (i.e., p62/SQSTM1). Flagged mitochondria are recruited by lipid-bound microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3-II) present on the double-membrane called pre-autophagosome structure. Sequestered dysfunctional mitochondria in the mitophagosome are ultimately delivered to lysosomes for degradation [64]. Perturbations of mitochondria physiology are considered hallmarks of several neurodegenerative disorders [28], including Alzheimer's disease (AD) [34].

AD is a progressive neurodegenerative pathology leading to dementia characterized by the accumulation in AD-affected brains of hyperphosphorylated Tau (pTau) protein and of toxic amyloid beta ($A\beta$) peptide, a product of amyloid precursor protein (APP) processing [19]. The processing of APP generates several fragments with partially documented physiopathological functions [23, 55]. APP C-terminal fragments (APP-CTFs) are produced through the cleavage of APP by β - and α -secretases generating C99 (99-amino acids) and C83 (83-amino acids), respectively. Subsequent cleavages of C99 and C83 by γ -secretase generate $A\beta$ and p3, respectively, and the APP intracellular domain (AICD). Noticeably, C99 also undergoes cleavage by α -secretase producing C83 [14, 29].

Most of AD-related mitochondrial dysfunctions including decreased ATP levels, impaired OXPHOS activity, disrupted mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$), and increased levels of ROS were described to be $A\beta$ -dependent in *in vitro* and *in vivo* AD study models [2, 68, 80]. Moreover, recent studies reported defective mitophagy linked to $A\beta$ and pTau [17, 35, 50, 69]. However, the specific role of APP-CTFs, and more particularly its deleterious accumulation [44], in mitochondrial structure, function, and mitophagy dysfunctions in AD remain to be deciphered. Strikingly, we and others recently demonstrated the localization of APP-CTFs in the subcellular microdomain between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria [20, 63], thus altering MAMs and mitochondrial membranes lipid composition [4, 63]. This questioned the possibility that APP-CTFs could be directly responsible for mitochondrial alterations observed in AD.

Our study is the first demonstration that, independently from $A\beta$, APP-CTFs accumulation either triggered by pharmacological blockade of its cleaving enzyme γ -secretase or after its overexpression leads to mitochondrial size alteration and cristae disorganization associated with enhanced

mitochondrial ROS production, and mitophagy failure phenotype in cells. These alterations were similarly observed in γ -secretase inhibitor-treated young 3xTgAD mice and in adeno-associated-virus (AAV)-C99 injected mice. Importantly, we also reported mitophagy failure correlating with mitochondrial APP-CTFs accumulation in a cohort of human sporadic AD (SAD) brains. Together, our data demonstrate that APP-CTFs accumulation specifically drives mitochondrial dysfunctions and mitophagy failure, thus providing a cellular basis for counteracting setting or progression of AD pathology.

Materials and methods

Human brain samples

All procedures performed in studies involving human brains were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical studies. Informed consent for tissue donation for research is obtained by the Brain Bank NeuroCEB and has been declared at the Ministry of Higher Education and Research (agreement AC-2013-1887) under their approval procedures. We studied control and SAD post-mortem human brains. Cases were anonymized, but information was provided regarding sex, age at death, and neuropathology (suppl. Table 1, online resource).

Mice models, treatments, and analyses

3xTgAD (APP^{swe}: KM670/671NL, TauP301L, and presenelin1 (PS1) M146V) and non-transgenic wild-type (WT) mice colonies were maintained from breeding pairs generously provided by Dr LaFerla [56]. As described previously, 2xTgAD expressing APP^{swe}, TauP301L, and wild-type PS1 were obtained in our laboratory by crossing the 3xTgAD with WT mice [43]. Therefore, the same WT mice with the original hybrid background (129-C57BL/6) were used as control for both 2xTgAD and 3xTgAD mice. Each strain line is maintained by intercross breeding and backcrossed with the original strain every 10 generations. Males and females were housed with a 12:12 h light/dark cycle and were given free access to food and water. All experimental procedures were in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and approved by the French Ministry of Higher Education and Research (Project no: APAFIS#20495-201904231352370).

Five-month-old 3xTgAD and WT females were treated daily with vehicle (methylcellulose/polysorbate 80) or γ -secretase inhibitor (ELND006, Elan Pharmaceuticals,

South San Francisco, CA [43]); (30 mg/kg) by oral gavage during 1 month. Animals were sacrificed 6 h after the last administration. We also used WT, 2xTgAD, and 3xTgAD males aged 17 months [11, 43], and new born males and females C57BL/6 mice injected with AAV-C99- or AAV-Free (empty virus) [45] and used at 2–3-month-old or 12-month-old. Mice brains were processed for SDS-PAGE, immunofluorescence or electron microscopy ultrastructure analyses.

For biochemical analyses, brains were isolated and stored in the RNA stabilization reagent (RNAlater, Qiagen) for 24 h and then dried and stored at -80°C until use. We used hippocampus of WT, 2xTgAD, and 3xTgD mice and total brains of AAV-Free and AAV-C99 injected mice.

For immunofluorescence and electron microscopy analyses, mice were anesthetized with a ketamine/xylazine (87 mg/ml and 13 mg/ml, respectively, 1 ml/kg) mixture and cardially perfused with PBS for 5 min and then with 10 ml PFA 4% solution (immunofluorescence) or with 10 ml of 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M cacodylate buffer (electron microscopy analyses). The whole brains were isolated and further post-fixed overnight at 4°C under agitation. For immunofluorescence, fixed brains were embedded in paraffin and coronal sections were cut with a sliding microtome (8 μm).

Cell lines and treatments

Cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$), and incubated at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere. Human SH-SY5Y cells stably expressing pcDNA3.1, full-length APP wild type (APPwt), or APP^{swe} constructs were generated as already described [59], and maintained in the presence of 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ geneticin (Gibco). Stable inducible SH-SY5Y cell line expressing C99 fragment was obtained by co-transfection of the Sleeping Beauty inducible vector (pSBtet SPC99) and the transposase SB100 as already described [42] and were maintained in the presence of 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ puromycin (Sigma-Aldrich). C99 expression was induced by the addition of doxycycline (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) (Sigma-Aldrich) for 48 h. We also used human embryonic kidney (HEK) cells (CRL-1573, ATCC). HEK cells were transiently transfected with pcDNA3.1 empty vector or C99 construct [29] using jetPRIME (polyplus transfection) following the manufacturer's instructions. Cells were analyzed 48 h post-transfection. Cells were treated with γ -secretase inhibitor ELND006 at 5 μM for 20 h, and β -secretase inhibitor at 30 μM for 20 h (Elan Pharmaceuticals, South San Francisco, CA [43]). For caspase-3 assays, cells were pretreated with staurosporine (STS) at 1 μM for 2 h (Sigma-Aldrich). For mitophagy analysis, cells were treated with deferiprone

(DFP) (Sigma-Aldrich) at 1 mM for 20 h, or carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone (CCCP) (Millipore-Sigma; St Quentin Fallavier, France) at 1 μM for 6 h.

Protein extraction and SDS-PAGE analysis

Total protein extracts were prepared using lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 10% glycerol, 200 mM NaCl, 0.5% Nonidet p-40, and 0.1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (Complete, Roche diagnostics). Mitochondrial fraction was isolated using isolation buffer (250 mM D-Mannitol, 5 mM HEPES pH 7.4, 0.5 mM EGTA, and 0.1% BSA) supplemented with protease inhibitor mixture. After chilling on ice for 20 min with frequent tapping, cells, mice brains, or dissected hippocampi were disrupted by 120 strokes of a glass Dounce homogenizer, and the homogenate was centrifuged at $1500 \times g$ at 4°C to remove unbroken cells and nuclei. Part of the supernatant was collected for total fraction, and the other part was centrifuged at $10,000 \times g$ at 4°C for 10 min to pellet mitochondrial fraction which was suspended in isolation buffer supplemented with protease inhibitors. Full-length APP, APP-CTFs, and $\text{A}\beta$ were resolved on 16.5% Tris-Tricine SDS-PAGE then transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were boiled in PBS, saturated in TBS, 5% skimmed milk, and incubated overnight with specific antibodies (suppl. Table 2, online resource). All the other proteins were resolved by SDS-PAGE following standard procedures.

Immunofluorescence and immunohistochemistry

Human and mice brain sections were deparaffined in xylene bath and rehydrated by successive 5 min baths of EtOH 100% (2 times), 90%, and then 70%. Antigens were unmasked in a 90% formic acid bath for 5 min for APP-Cter and 82E1 antibodies (Fig. 10g), or for 30 min in a pressure cooker with pH6 citric acid solution (Vector Laboratories) for APP-Cter and TIMM23 antibodies co-staining (Fig. 8c). Non-specific binding was blocked for 1 h in 5% BSA, 0.05% Triton in PBS solution. Sections were incubated at 4°C overnight with primary antibodies (suppl. Table 2, online resource). After washes, sections were incubated with secondary antibodies [HRP-conjugated (1:1000; Jackson ImmunoResearch) or fluorescent Alexa Fluor antibodies, and Alexa 488- and Alexa 594-conjugated (Invitrogen; 1:1000)] at room temperature during 1 h. Nuclei were revealed with DAPI (Roche; 1:20,000). Immunofluorescence was visualized with SP5 confocal microscopes. Slides with HRP-conjugated antibodies were incubated with DAB-impact (Vector), rinsed, and counterstained with cresyl violet, and analyzed using an optical light microscope (DMD108; Leica).

Cells were plated directly on glass coverslip (pre-washed with 70% ethanol) and cultured as described previously. Transfected and/or treated cells were washed with PBS and then fixed with 4% PFA 20 min. Cells were permeabilized with 0.5% Triton-PBS and finally incubated with a 3% BSA blocking solution for 1 h. Coverslips were covered with a solution of 0.3% BSA with diluted primary antibodies overnight (suppl. Table 2, online resource). Fluorescent secondary antibodies were added after PBS wash for at least 1 h and nuclei were stained with Dapi (1/10,000). Coverslips were mounted on glass slides with Vectamount medium (Vector). Images were acquired with SP5 confocal microscope and processed using ImageJ software.

Measurements of mitochondrial superoxide and of mitochondrial potential

MitoSOX Red is a fluorogenic dye for highly selective detection of superoxide in the mitochondria of living cells [70]. Cells were incubated in 5 μ M MitoSOX red mitochondrial superoxide indicator (Invitrogen) in DMEM for 30 min, at 37 °C. Cells were harvested and rinsed twice with ice-cold HBSS complemented with 1 mM CaCl_2 and 0.5 mM MgCl_2 . Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is a cell-permanent dye that accumulates in active mitochondria with intact membrane potentials. Loss of mitochondrial membrane potential triggers reduced TMRM accumulation. Cells were harvested, rinsed with PBS, and incubated in TMRM (prepared in DMEM) (2 nM) for 30 min at 37 °C. TMRM and MitoSox fluorescence median intensities were then analyzed in the Novocyte Flow Cytometer (ACEA bio-science, Inc) excitation/emission 510 nm/580 nm. TMRM fluorescence signal was also acquired on a Leica SP5 confocal microscope with 63 \times objective, after loading cells with TMRM (2 nM) in KRB/1 mM CaCl_2 for 30 min at 37 °C. To demonstrate specific TMRM binding, measurements were corrected for residual TMRM fluorescence after full mitochondrial membrane collapse with the mitochondrial uncoupler FCCP (trifluoromethoxy carbonylcyanide phenylhydrazine) [22].

Transmission electron microscopy

For ultrastructure analysis, cells were fixed in 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), rinsed with cacodylate buffer 0.1 M, and then post-fixed in osmium tetroxide (1% in cacodylate buffer) reduced with potassium ferricyanide (1%) for 1 h. Fixed mice brains were sliced (200 μ m) on a vibratome. Two mm³ cubes from the cortical regions or subiculum were microdissected under binoculars and post-fixed in osmium tetroxide (1% in cacodylate buffer 0.1 M). Cells and tissue were dehydrated with several incubations in increasing concentrations of ethanol or

acetone, respectively, and embedded in epoxy resin (EPON), and 70 nm ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Transmission Electron Microscope (JEOL JEM 1400) operating at 100 kV and equipped with a Olympus SIS MORADA camera. We used ImageJ software to analyze mitochondria ultrastructure and to measure mitochondria perimeter, area and number.

Respiratory chain complexes activity

Enzymatic spectrophotometric measurements of the OXPHOS respiratory chain complexes and citrate synthase were performed at 37 °C on cells according to standard procedures [73]. The Krebs cycle enzyme citrate synthase was used as control for similar mitochondria content between samples [73].

Caspase 3 activity

Cells were cultured in 6-well plates and then incubated for 24 h at 37 °C in the presence or absence of STS. In some cases, cells were either pre-incubated overnight with γ -secretase inhibitor ELND006. Caspase 3 activity was then measured as described [18]. Fluorometry was recorded at 390 and 460 nm for excitation and emission wavelengths, respectively, by means of a plate reader (Varioskan, ThermoFisher scientific). Caspase3-like activity was calculated from the linear part of fluorimetry recording and expressed in units/h/mg of proteins. One unit corresponds to 4 nmol of amidomethylcoumarin released.

Mitophagy analysis

Cells were transfected with Cox8-EGFP-mCherry (a gift from David Chan; Addgene plasmid # 78520 [71]), LC3-GFP probe or co-transfected with Lamp1-GFP (a gift from Falcon-Perez; Addgene plasmid # 34831 [26]), and Mit-RFP probes using lipofectamine. Cells were treated 24 h after transfection and analyzed 24 h later. The Cox8-EGFP-mCherry mitophagy reporter is based on differences in pKa of green fluorescent protein (EGFP), and mCherry expressed in tandem with the mitochondrial localization signal of Cox8. Under normal conditions, mitochondria fluoresce red and green (yellow colocalization signal). In mitophagy, mitochondria are delivered to lysosomes where the low pH quenches the EGFP signal (scheme in Fig. 5h). The result is that a portion of mitochondria fluoresce red only. Data are presented as the percentage of cells undergoing mitophagy. A threshold of a single or more red-alone puncta per cell was applied to all cells expressing Cox8-EGFP-mCherry probe. LC3-GFP transfected cells were subjected to immunostaining with HSP60 antibody. Data are presented as the percentage of cells harboring diffuse versus dotted LC3-GFP

signal. The colocalization of Lamp1-GFP with Mit-RFP was determined using ImageJ plug-in JACoP (Just Another Colocalization Plug-in [9]). Data represent Mander's coefficient of Mit-RFP with LAMP1-GFP signal. Cells were observed with Leica SP5 or Zeiss LSM 780 with 63X Objective.

Statistical analyses

Data were expressed as means \pm SEM. Sample size for each experiment is indicated in the figure captions. We studied control ($n=9$) and SAD ($n=15$) human brains by SDS-PAGE and SAD human brains ($n=6$) by immunohistochemistry. Cells analyses were obtained in at least three independent experiments in duplicates or triplicates (unless were indicated), while the quantification of imaging experiments was performed on different (>5) fields of view. SDS-PAGE analyses using mice brains/hippocampi were performed in 4–7 different mice, while immunofluorescence and electron microscopy analyses were performed in 2–3 different mice. Data were analyzed with GraphPad Prism version 8 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; <https://www.graphpad.com>). Data were first analyzed for normal distribution. We used the Mann–Whitney test when the two groups of variables have not passed the normality test. Groups of more than two variables that have passed normality test were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett's or Tukey's multiple comparisons post-test. Kruskal–Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test was used when groups of variables have not passed the normality test. Correlations were analyzed with Spearman's correlation coefficient. Significant differences are: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ and ns: non-significant.

Results

Mitochondrial structure and function are altered in a cellular model of familial AD

We analyzed mitochondrial structure and function in the neuroblastoma cells expressing the Swedish familial double mutations (APPKM670/671NL: SH-SY5Y APPswe). These cells exacerbate the production of APP-CTFs (C99 and C83 derived from the cleavage of APP by β and α secretases, respectively), and amyloid beta ($A\beta$) peptides (produced through the subsequent cleavage of C99 by γ -secretase) [59]. We examined mitochondria morphology and size by transmission electron microscopy. We first observed that APPswe-expressing cells harbor larger size mitochondria with altered cristae organization than control cells (colored arrowheads in Fig. 1a). We analyzed in depth mitochondrial alterations and classified mitochondria morphology in four categories (class I: fairly

dark mitochondria, with uniform matrix filled with dense packed regular distributed cristae; class II: mitochondria with disrupted cristae and loss of matrix density; class III: empty mitochondria with disorganized cristae, or cristae on the periphery; and class IV: swollen mitochondria with disrupted membrane) (Fig. 1b). Quantification of mitochondria subclasses was then recorded revealing that while control cells exhibited 86% of mitochondria class I, 10% class II, 3% class III, and 1% class IV (Fig. 1c and suppl. Table 3, online resource), APPswe cells displayed a drastic reduction of “healthy” mitochondria class I (29%), and a concomitant enhancement of mitochondria class II (43%), III (12%), and IV (16%) (Fig. 1c and suppl. Table 3, online resource). We then showed that APPswe cells also displayed larger mitochondria (increased area and perimeter) (Fig. 1d, e and suppl. Table 3, online resource), with a significant decrease of mitochondrial number (Fig. 1f and suppl. Table 3, online resource) as compared to control cells.

Mitochondria are dynamic organelles requiring appropriate finely tuned equilibrium between fission and fusion. To corroborate structural alterations observed in APPswe cells, we measured the levels of mitochondrial fission protein (DNM1L/DRP; dynamin 1-like) and fusion proteins (MFN1; mitofusin 1, and MFN2; mitofusin 2) at the mRNA and protein levels (Suppl. Figure 1a–e, online resource). While we did not reveal a modulation of DRP1, MFN1, and MFN2 mRNAs levels between APPswe cells and their controls (Suppl. Figure 1a, online resource), the protein levels of DRP1, MFN1, and MFN2 were significantly lower in APPswe cells in both total and mitochondria-enriched protein extracts (Suppl. Figure 1b–e, online resource). These data show molecular perturbations of mitochondrial fission/fusion equilibrium supporting mitochondria morphological phenotypes taking place in APPswe cells.

Mitochondria structure alterations observed in APPswe cells are accompanied by several mitochondrial dysfunctions as demonstrated by a reduction of mitochondrial complex I NDUFB8 subunit expression (Fig. 1g, h), while the levels of mitochondrial complexes subunits II, III, IV, and V remained unchanged (Fig. 1g and suppl. Figure 1f, online resource). This was corroborated by a specific reduction of mitochondrial complex I activity (Fig. 1i), but not of complexes II, III, IV, and V (Suppl. Figure 1g–j, online resource) in APPswe cells. The Krebs cycle citrate synthase enzyme remained also unchanged between APPswe cells and their controls (Suppl. Figure 1k, online resource). In agreement with a dysfunctional respiratory chain complex I, APPswe cells showed a reduction of mitochondrial membrane potential, revealed by reduced TMRM fluorescence intensity (Fig. 1j, k).

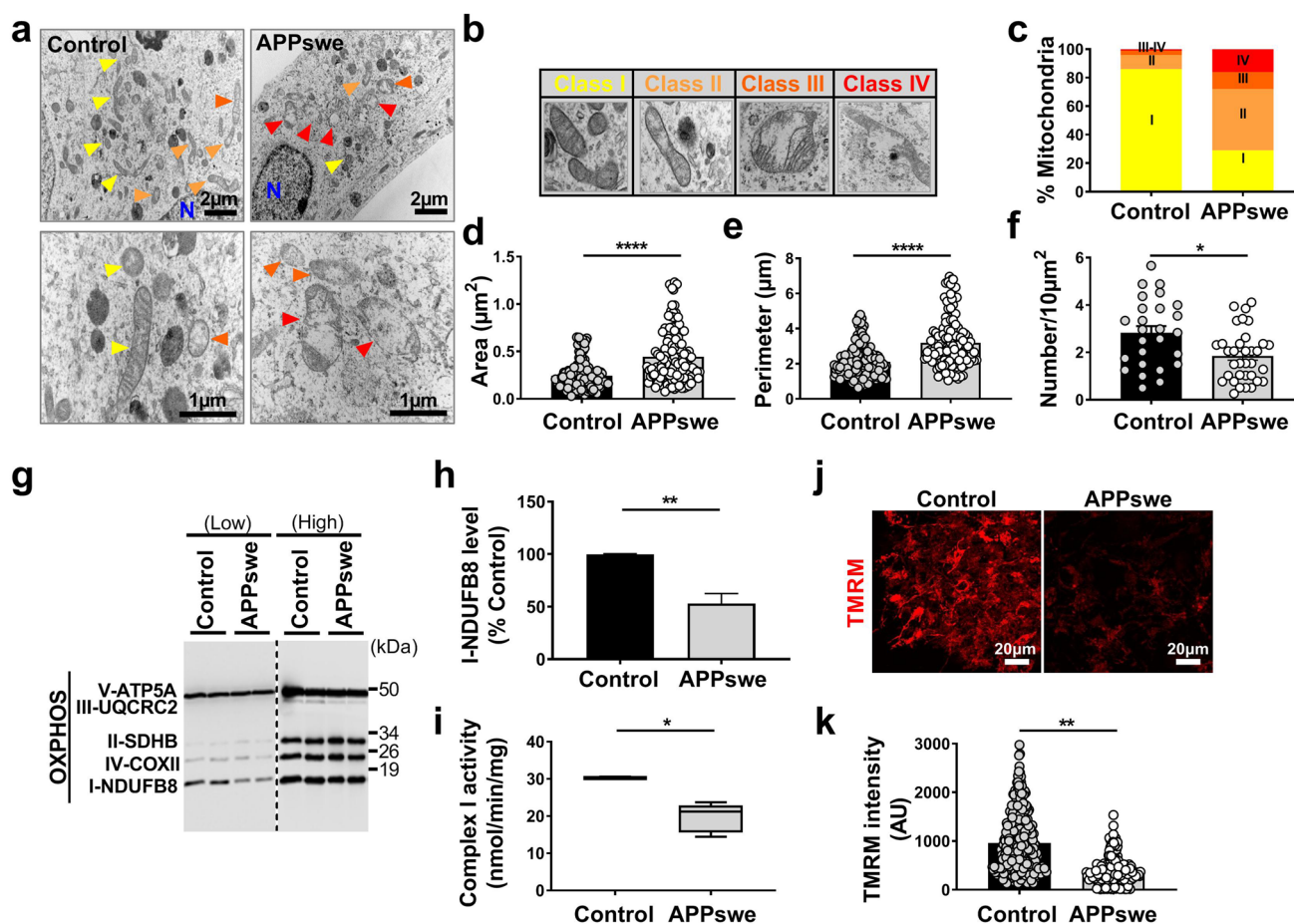


Fig. 1 SH-SY5Y cells expressing APPswe display altered mitochondrial structure and function. **a** Electron microscopy ultrastructure of SH-SY5Y cells stably transfected with pcDNA3.1 empty vector (control) or with APPswe cDNA (APPswe). Scale bars correspond to 2 or 1 μm. *N* nucleus. Colored arrowheads indicate mitochondria. Representative images of mitochondria classes I, II, III, and IV (**b**), and their quantitative distribution (**c**) in control and APPswe cells. Quantitative graphs of the means ± SEM of mitochondria area (μm²) (**d**), perimeter (μm) (**e**), and number/10 μm² (**f**). **a–f** Data were obtained in two independent experiments performed in duplicates. The quantification was done in at least 20 different fields (> 150 mitochondria).

g SDS-PAGE of mitochondrial OXPHOS subunits at low and high exposures revealed in total cell extracts revealed using OXPHOS antibodies mix. **h** Complex I-NDUFB8 subunit expression presented as means ± SEM (*n*=4) of control (taken as 100%). **i** Spectrophotometric analysis of the respiratory chain complex I activity expressed as absolute values in nanomols of substrate/min/mg of proteins and presented as means ± SEM (*n*=3). Confocal images of TMRM fluorescence (**j**) (scale bars represent 20 μm), and quantification of TMRM fluorescence intensity (AU arbitrary units) (**k**) (*n*=3, > 150 cells). **P*<0.05, ***P*<0.01, and *****P*<0.0001 versus control using Mann–Whitney test

APP-CTFs accumulation triggers mitochondrial structure alterations in cells independently of Aβ

Several studies reported that mitochondrial structure and function alterations are linked to Aβ [15, 34, 46]. We aimed hereafter at investigating the specific contribution of APP-CTFs versus Aβ to mitochondrial structure and function alterations reported in our APPswe cellular model. Thus, we pharmacologically targeted γ-secretase, the inhibition of which blocks Aβ peptide formation and enhances CTFs' recovery (as we already reported [13, 45]). Immunological analyses with 6E10 antibody (revealing full-length APP, C99, and Aβ) or APP-Cter antibody (revealing C99, and

C83, and APP intracellular domain (AICD) (Fig. 2a) confirmed that γ-secretase inhibition enhanced the accumulation of APP-CTFs (C99 and C83) and blocked Aβ peptide production in total extracts (Fig. 2a, b) as well as in mitochondria-enriched fraction (Fig. 2a, c) without affecting the level of full-length APP (Fig. 2a–c). Unexpectedly, γ-secretase inhibition did not significantly modify AICD levels in both total homogenates and mitochondria-enriched fraction (Fig. 2a–c). We further demonstrated by immunofluorescence analyses, using the two sets of antibodies (6E10 and APP-Cter), that APP and APP-CTFs colocalize with the mitochondrial protein HSP60 in untreated and in γ-secretase inhibitor-treated APPswe cells (Fig. 2d, e).

These biochemical and imaging analyses firmly demonstrate that APP-CTFs are present in mitochondria compartment, thus questioning their contribution to mitochondrial structure alterations observed in this AD cellular model.

We took advantage of this pharmacological approach and analyzed mitochondria structure using electron microscopy, and revealed that γ -secretase inhibitor-treated APP^{sw} cells display spherical and fragmented mitochondria (colored arrowheads in representative images in Fig. 2f). The quantification of mitochondria subclasses showed that γ -secretase inhibitor-treated APP^{sw} cells harbor a loss of mitochondria class I (1%) and swollen mitochondria class IV (2%) with a drastic shift of mitochondrial shape towards mitochondrial classes II and III (47%, and 50%, respectively) (Fig. 2g and suppl. Table 3, online resource). This mitochondrial morphology shift was accompanied by a significant reduction in mitochondria size (area and perimeter) (Fig. 2h, i and suppl. Table 3, online resource), and an increase of mitochondria number in γ -secretase inhibitor-treated APP^{sw} cells (Fig. 2j and suppl. Table 3, online resource). We further strengthened these observations by analyzing mitochondrial three-dimensional (3D) structure in living cells using mitotracker dye and confocal imaging (suppl. Figure 2a, online resource). Thus, γ -secretase inhibition increases mitochondrial number (Suppl. Figure 2a, b, online resource), and reduces mitochondrial network 3D volume (Suppl. Figure 2a, c, online resource). As observed in APP^{sw} untreated cells (Suppl. Figure 1a, online resource), mitochondrial size alteration observed upon γ -secretase inhibition is not corroborated by a modulation of DRP1 and MFN2 mRNA levels (Suppl. Figure 2d, online resource). Nevertheless, we reported a significant increase of MFN2 protein level in APP^{sw} cells treated with γ -secretase inhibitor, while DRP1 protein level remained unchanged (Suppl. Figure 2e, online resource).

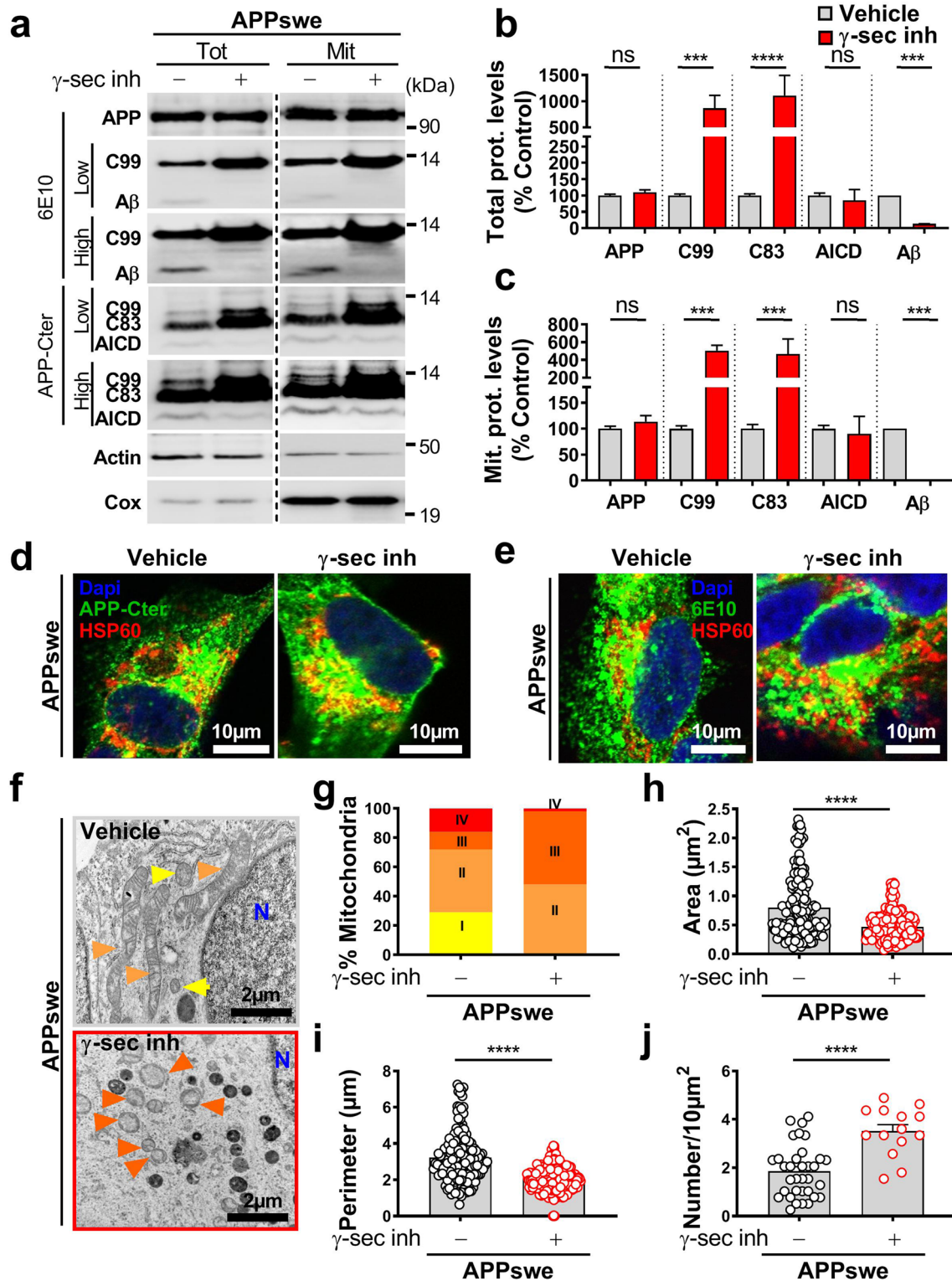
We further investigated the contribution of APP-CTFs versus A β to mitochondria structure alterations by analyzing APP^{sw} cells treated with β -secretase inhibitor, blocking the production of A β , reducing APP- β CTF (C99) level, and enhancing the level of APP- α CTF (C83) (Suppl. Figure 3a-c, online resource). As for γ -secretase inhibitor, we also did not notice any significant change of AICD level upon β -secretase inhibition (Suppl. Figure 3a-c, online resource). Importantly, we revealed by electron microscopy analyses that β -secretase inhibition triggers a recovering of mitochondria class I morphology (76%) and a reduction of mitochondria classes II, III, and IV (13%, 7%, and 4%, respectively, suppl. Figure 3d, e, online resource, and suppl. Table 3, online resource). Thus, the comparative analyses of the impact of β - versus γ -secretase inhibitors on mitochondria structure demonstrate that both A β and APP-CTFs participate to mitochondrial structure alterations in APP^{sw}-expressing cells and that γ -secretase-mediated APP-CTFs accumulation independently from A β exacerbate mitochondrial morphological

alterations specifically characterized by cristae disorganization (mitochondria classes II and III) and changes in mitochondria size and number.

We also investigated the impact of the accumulation of endogenous APP-CTFs on mitochondrial structure upon γ -secretase inhibition in mock (pcDNA3.1)-transfected SH-SY5Y cells. We revealed low amount of endogenous APP-CTFs in both total and mitochondrial fraction of mock-transfected SH-SY5Y cells (as compared to APP^{sw} cells) correlating with a low-level expression of full-length APP (Suppl. Figure 4a, online resource). We also noticed the accumulation of endogenous APP-CTFs in control cells upon γ -secretase inhibitor treatment both in total and mitochondria-enriched fraction (Suppl. Figure 4b, online resource). Immunofluorescence analyses support this finding and show enhanced signal detected with APP-Cter antibody colocalizing with mitochondrial protein HSP60 in γ -secretase inhibitor-treated-control cells (Suppl. Figure 4c, online resource). We then revealed that endogenous APP-CTFs accumulation led to mitochondria structure alteration (66% class II, and 30% class III) (Suppl. Figure 4d, e, online resource, and suppl. Table 3, online resource), reduced size (Suppl. Figure 4d, f, g, online resource, and suppl. Table 3, online resource), and increased number (Suppl. Figure 4h, online resource, and suppl. Table 3, online resource). Thus, γ -secretase inhibition that triggers accumulation of endogenous or overexpressed APP-CTFs leads to similar structural mitochondria alterations in cells (Fig. 2f–j, suppl. Figure 4d–h, online resource, and suppl. Table 3, online resource).

Mitochondrial function and apoptosis are differently impacted by A β and APP-CTFs

We investigated the consequences of mitochondrial APP-CTFs accumulation on mitochondrial function. We first showed that both γ -secretase and β -secretase inhibition enhanced the expression level of NDUFB8 complex I subunit (Fig. 3a, b and suppl. Figure 3f, online resource), and accordingly the activity of respiratory complex I (Fig. 3c and suppl. Figure 3g, online resource), without altering the expression levels (Suppl. Figure 5a, online resource) or activities (Suppl. Figure 5b–e, online resource) of mitochondrial complexes II, III, IV, and V. Citrate synthase enzyme remained also unchanged upon γ -secretase inhibition (Suppl. Figure 5f, online resource). Similarly, we did not notice any change in mitochondrial complexes II, III, IV, and V expression and activities upon β -secretase inhibition (data not shown). We then reported that reduced mitochondrial potential in untreated APP^{sw} cells (compared to their controls) was unaffected by γ -secretase inhibitor (Fig. 3d and representative histograms in suppl. Figure 5g, online resource), but was restored by



β-secretase inhibitor (suppl. Figure 3h, online resource). However, we observed enhanced mitochondrial ROS accumulation in APP^{swe} versus control cells that was further exacerbated upon γ-secretase inhibition (Fig. 3e and

suppl. Figure 5h, online resource), and unchanged upon β-secretase inhibition (data not shown).

We then quantified caspase-3 activation known as an executioner caspase in mitochondrial-dependent apoptosis and used fluorometric and immunoreactivity approaches [18].

Fig. 2 APP-CTFs accumulate in mitochondria and trigger mitochondrial structure alteration in cells. **a** SDS-PAGE (low and high exposures) of APP and its indicated metabolites in vehicle (–) or γ -secretase inhibitor- (γ -sec inh) (+) (5 μ M, 20 h) treated APP^{sw} cells revealed in total cell extracts (Tot), and mitochondrial-enriched fraction (Mit). Full-length APP (APP), C99, and A β detected with 6E10 antibody, and C99, C83, and AICD detected with APP-Cter antibody. Actin and Cox IV antibodies were used as loading controls for total and mitochondria-enriched fractions, respectively. Quantitative graphs of indicated proteins in total extracts (**b**) and mitochondrial fraction (**c**) expressed as means \pm SEM ($n=5$) versus controls (taken as 100%). **d, e** Immunostaining of SH-SY5Y APP^{sw} cells treated as in (**a**) with APP-Cter or 6E10 antibodies (green) in combination with anti-HSP60 (red) used to stain mitochondria. Nuclei were labeled with DAPI. Images show merge of green and red signals reflecting the colocalization in yellow. Scale bars represent 10 μ m. **f** Electron microscopy ultrastructure of SH-SY5Y APP^{sw}-treated as in (**a**). Scale bars correspond to 2 μ m. *N* nucleus. Colored arrowheads indicate mitochondria classes as shown in Fig. 1b. Quantitative graphs of mitochondria classes (**g**), and means \pm SEM of mitochondria area (μ m²) (**h**), perimeter (μ m) (**i**), and number/10 μ m² (**j**). **f–j** The quantification was obtained in two independent experiments performed in duplicates in at least 20 different fields (> 150 mitochondria). **b, c** *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$, and *ns* non-significant using Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison post-test. **h–j** **** $P < 0.0001$ versus vehicle (–) using Mann–Whitney test

We first showed higher sensitivity to a sub-apoptotic dose of staurosporine in APP^{sw} cells as compared to control cells as illustrated by enhanced caspase-3 activity and cleaved caspase-3 (c-Casp 3: active form) (Fig. 3f–h). Although γ -secretase inhibitor did not impact caspase-3 activity in basal conditions (Fig. 3f), it triggers a significant reduction of STS-induced caspase-3 activity (Fig. 3f), and cleavage (Fig. 3i, j) in APP^{sw} cells. We also confirmed the reduction of caspase-3 activity with two different γ -secretase inhibitors DFK, and DAPT in STS-treated APP^{sw} cells (Suppl. Figure 5i, online resource). Similarly, we also observed a reduction of STS-induced caspase-3 activity upon treatment with β -secretase inhibitor (Suppl. Figure 3i, online resource).

We ascertain the specificity of γ -secretase inhibitor towards APP substrate using SH-SY5Y control cells and mouse embryonic fibroblasts (MEF) isolated from control mice (MEF-WT) or from mice genetically invalidated for both APP and its additional family member APLP2 gene (MEF-APPKO) (Suppl. Figure 6, online resource). We showed that γ -secretase inhibitor: (1) did not significantly change mitochondrial potential in SH-SY5Y control cells (Suppl. Figure 6a, online resource), and in MEF-WT and MEF-APPKO cells (Suppl. Figure 6b, online resource); (2) did not change STS-induced caspase-3 activity in MEF control and APPKO fibroblasts (Suppl. Figure 6e, online resource). Importantly, we reported increased mitochondrial ROS in SH-SY5Y control cells (Suppl. Figure 6c, online resource) and in MEF-WT cells but not in MEF-APPKO cells (Suppl. Figure 6d, online resource) treated with γ -secretase inhibitor. Thus, γ -secretase inhibitor-induced

mitochondrial deleterious phenotype appears to be APP-dependent.

Overall, these results revealed the contribution of both A β and APP-CTFs to mitochondrial dysfunctions. The comparative analyses of the impact of γ -secretase versus β -secretase inhibitors in APP^{sw} cells emphasized the role of A β in mitochondrial respiratory chain complex I dysfunction, mitochondrial membrane potential loss, and caspase-3 activation and that of APP-CTFs accumulation in mitochondrial ROS elevation.

To further explore the contribution of APP-derived CTFs to mitochondrial dysfunctions, we used the neuroblastoma stable and inducible cell line expressing C99 fragment only [45]. First, as we previously described [29], we observed that C99 undergoes a γ -secretase-mediated cleavage giving rise to a high C83 expression (Fig. 4a, b). We also showed enhanced C99 and C83 fragments in mitochondrial-enriched fraction prepared from C99-expressing cells as compared to mock-transfected cells (control) (Fig. 4a, b). As observed in APP^{sw} cells (Fig. 2a–c), the treatment with γ -secretase inhibitor enhanced C83 level in both C99 and control cells (Fig. 4a, b). We further demonstrated that both endogenous and overexpressed APP-CTFs colocalize with mitochondrial HSP60 protein as illustrated in C99 cells untreated and in control and C99 cells treated with γ -secretase inhibitor (Fig. 4c). We next examined whether C99 expression triggers mitochondrial dysfunction. Indeed, like APP^{sw} cells, C99-expressing cells harbor a reduction of the expression of NDUFB8 (Fig. 4d, e) and of the activity of respiratory chain complex I (Fig. 4f), without altering the mitochondrial complexes II, III, IV, and V subunit expression and their activities (Suppl. Figure 7a–e, online resource), and citrate synthase activity (Suppl. Figure 7f, online resource). C99 overexpression triggers an increase of mitochondrial ROS production (Fig. 4g), and intriguingly enhanced mitochondrial membrane potential (Fig. 4h), both remained elevated upon γ -secretase inhibitor treatment. We also revealed that C99-expressing cells harbor a slight but not-significant increase in staurosporine-induced apoptosis that remained not modulated by γ -secretase inhibitor (Fig. 4i). All over, these data demonstrate the colocalization of overexpressed C99 with mitochondria triggering mitochondrial dysfunctions, and that APP-CTFs accumulation per se did not lead to apoptotic cell death.

APP-CTFs accumulation leads to basal mitophagy failure in cells independently of A β

Mitochondrial fragmentation and enhanced ROS production are considered major paradigms for selective elimination of superfluous or dysfunctional mitochondria by a specific autophagy process known as mitophagy [64]. We thus questioned the putative contribution of APP-CTFs

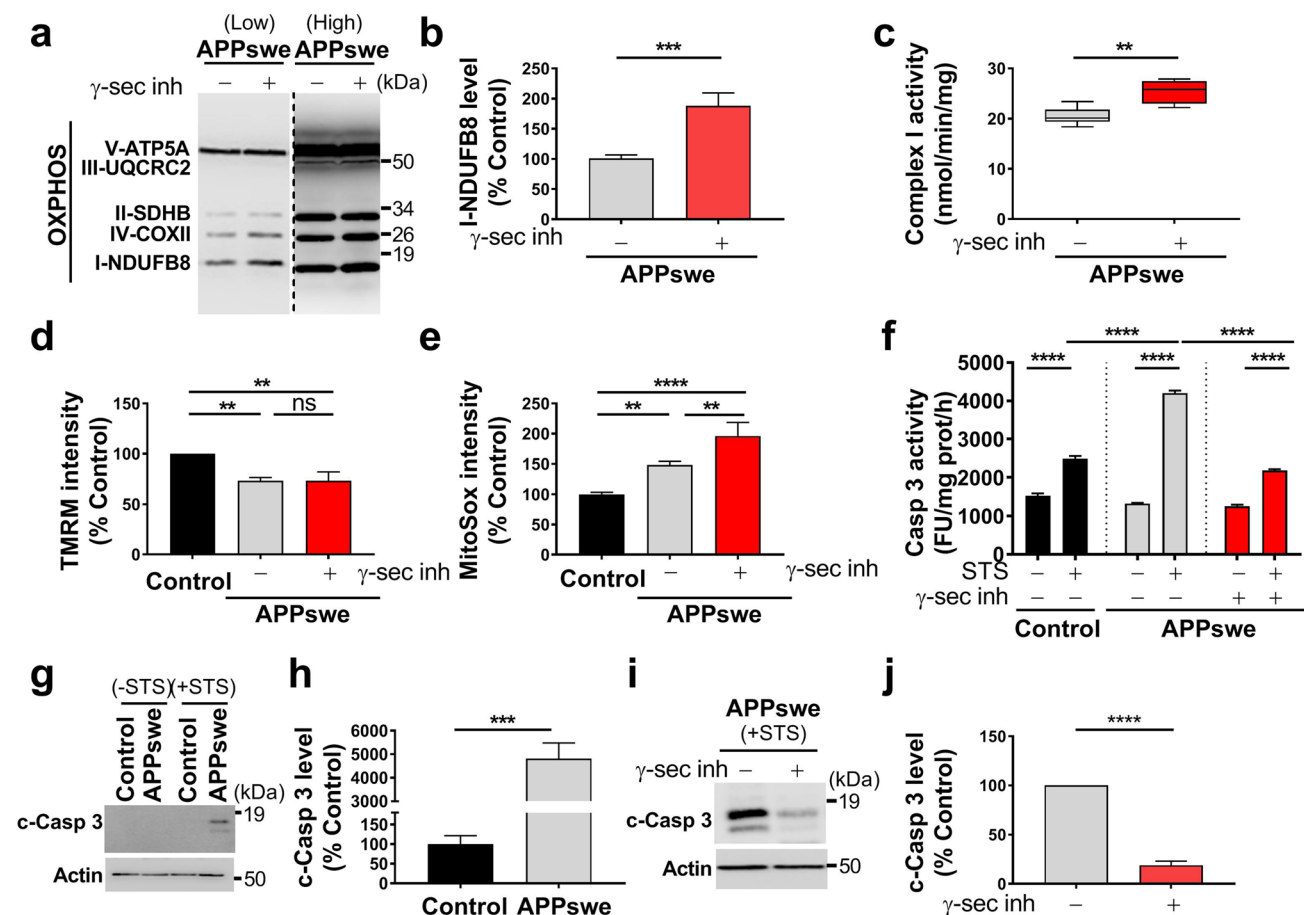


Fig. 3 APP-CTFs accumulation triggers mitochondria dysfunction in cells. **a** SDS-PAGE (low and high exposures) of mitochondrial OXPHOS subunits observed in total cell extracts of SH-SY5Y APP_{sw} cells treated with vehicle (–) or γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (+) (5 μ M, 20 h). **b** Complex I-NDUFB8 subunit expression presented as means \pm SEM ($n=5$) of control cells (taken as 100%). **c** Spectrophotometric analysis of the respiratory chain complex I activity expressed as absolute values in nanomols of substrate/min/mg of proteins and presented as means \pm SEM ($n=4$). **d**, **e** TMRM median intensity (**d**) and MitoSox median intensity (**e**) obtained by FACS analyses in control and APP_{sw} cells treated as in (**a**). Data are expressed as means \pm SEM ($n=3$ –5) of control (taken as 100%). **f** Caspase 3-like activity under basal and staurosporine (STS) stim-

ulation (1 μ M, 2 h) in the same experimental conditions as in (**d**) and expressed as fluorescence intensity (fluorescence units (FU)/mg protein/h) \pm SEM ($n=6$ –7). **g**–**j** SDS-PAGE (**g**, **i**) and quantitative graphs (**h**, **j**) of cleaved caspase-3 (c-Casp 3) band in the same experimental conditions as in (**f**). Actin was used as loading control. **h**, **j** c-Casp levels are expressed as means \pm SEM ($n=4$ –6) of respective control conditions (taken as 100%). **b**, **h**, **j** **** $P < 0.0001$, **** $P < 0.0001$ versus control or vehicle-treated APP_{sw} cells using *t* test. **c** ** $P < 0.01$ versus vehicle-treated APP_{sw} cells using Mann-Whitney test. **d**, **e**, **f** ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, and ns: non-significant using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test

accumulation to mitophagy. We examined the induction of basal autophagy through the conversion of soluble microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3-I) to lipid-bound LC3-II and quantified their expression levels and that of the autophagy substrate SQSTM1/p62 (named p62 hereafter). We specifically quantified LC3 conversion and p62 level in mitochondrial fraction. Our data show a slight but not significant increase of LC3-I but a drastic enhancement of LC3-II level and LC3-II/LC3-I ratio, indicating a basal autophagy induction in APP_{sw} cells (Fig. 5a, b). We further measured mitophagy using LC3-GFP probe and fluorescence microscopy, and confirmed

the conversion of LC3-I to LC3-II through aggregation and colocalization of LC3-GFP with HSP60 mitochondrial protein in APP_{sw} cells (Fig. 5e). Paradoxically, the level of p62 remained unchanged (Fig. 5a, b). The increase in LC3-I conversion, LC3-II accumulation, and unchanged p62 levels supports enhanced basal autophagy induction and a blockade in downstream degradation. We then analyzed mitochondrial mitophagy priming occurring through PINK1/Parkin pathway [87]. We observed significantly enhanced levels of Parkin and PINK1 in mitochondrial fraction isolated from APP_{sw} as compared to control cells (Fig. 5a, c). Increased Parkin recruitment to mitochondria was further confirmed

by immunofluorescence through its colocalization with mitochondrial HSP60 protein in APPsw cells (Fig. 5f). Accordingly, we also showed a slight increase of mitochondrial localization of phospho-poly-ubiquitin (p-S65-Ub: p-Ub), a PINK1 substrate recruited by Parkin to mitochondria [87] in APPsw cells (Fig. 5f). As control, we analyzed protonophore carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazine (CCCP)-induced mitophagy and showed enhanced Parkin and p-Ub localization within mitochondria in both control and APPsw-treated cells (Fig. 5f).

Activated mitophagy process is reflected by enhanced degradation of mitochondrial outer and inner membrane and matrix proteins. SDS-PAGE analyses performed on mitochondria-enriched fraction showed increased levels of several mitochondrial proteins (TOMM20, TIMM23, HSP60, and HSP10) in APPsw cells (Fig. 5a, d), suggesting a compromised targeting of dysfunctional mitochondria to lysosomal compartment and/or its defective degradation. Indeed, we observed reduced colocalization of mitochondria with lysosomes in APPsw versus control cells as illustrated through the analyses of the colocalization of mitochondrial Mit-RFP probe with lysosomal LAMP1-GFP probe (Fig. 5g). Furthermore, we used Cox8-EGFP-mCherry mitophagy reporter, [71] (Fig. 5h left) and reported a not statistically different number of cells harboring red mitochondria puncta in APPsw and control cells, thus attesting for defective mitochondrial engulfment in lysosomal acidic compartment (Fig. 5h, i). We validated Cox8-EGFP-mCherry mitophagy reporter by demonstrating enhanced mitophagy (cells harboring red punctae) in control and APPsw cells treated with the iron chelator DFP (deferiprone) (a potent mitophagy inducer in SH-SY5Y cells [1] (Fig. 5h, i), and with a combination of oligomycin A and antimycin A in APPsw cells [1] (Suppl. Figure 8a, online resource).

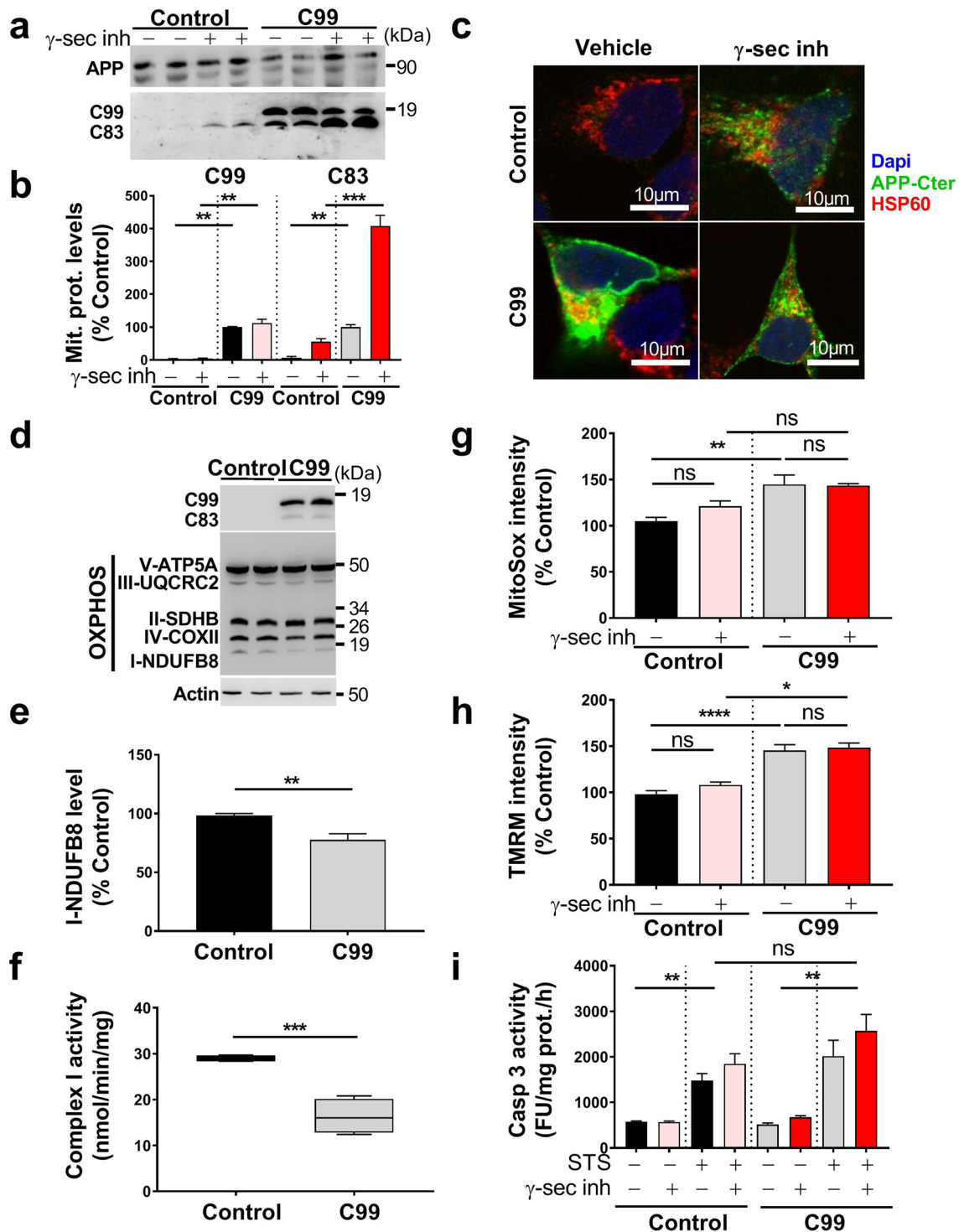
Importantly, pharmacological blockade of γ -secretase in APPsw cells definitely demonstrates that mitophagy failure could be accounted by APP-CTFs accumulation (Fig. 6a–e). Hence, APPsw-treated cells showed a huge increase of LC3-II level and LC3-II/LC3-I ratio, unchanged levels of p62 in mitochondria-enriched fraction (Fig. 6a, b), and enhanced total p62 fluorescence (Suppl. Figure 8b, online resource), attesting for basal autophagy induction and degradation defect. APPsw cells treated with γ -secretase inhibitor also showed defective mitophagy priming with a slight but non-statistically significant increase of Parkin and PINK1 levels in mitochondria (Fig. 6a, c). Unchanged Parkin and p-Ub targeting to mitochondria were further showed by immunofluorescence analyses (Suppl. Figure 8b, online resource). Accordingly, a significant increase of mitochondrial proteins (TOMM20, TIMM23, HSP60, and HSP10) (Fig. 6a, d) in mitochondria-enriched fraction suggested a compromised targeting of dysfunctional mitochondria to lysosomes and

their degradation in γ -secretase inhibitor-treated APPsw cells. Indeed, we revealed unchanged colocalization of Mit-RFP probe with LAMP1-GFP probe (Suppl. Figure 8c, online resource), and confirmed unchanged number of mitochondria in fusion with lysosomes using Cox8-EGFP-mCherry probe (Fig. 6e).

Importantly, γ -secretase inhibitor-mediated accumulation of endogenous APP-CTFs was also associated with mitophagy failure in SH-SY5Y control cells characterized by enhanced LC3-II/LC3-I ratio unchanged levels of mitochondrial p62 (Suppl. Figure 9a, b, online resource), enhanced total p62 staining (Suppl. Figure 9d, online resource), unchanged Parkin, and p-Ub (Suppl. Figure 9a, c, and d, online resource), and a significant increase of TIMM23, and HSP10 expressions (Suppl. Figure 9a, c, online resource). We confirmed this mitophagy failure phenotype by showing unchanged colocalization of Mit-RFP probe with LAMP1-GFP probe upon γ -secretase inhibitor treatment (Suppl. Figure 9e, online resource).

Accordingly, we validated mitophagy defect in C99 cellular model and showed a slight but no-statistically significant increase of LC3-II level and LC3-II/LC3-I ratio (Fig. 6f, g) associated with a significant increase of p62 (Fig. 6f, g), unchanged PINK1 and Parkin (Fig. 6f, h), and enhanced TOMM20, and HSP10 expression levels (Fig. 6f–i). Both control and C99-expressing cells treated with γ -secretase inhibitor also showed a mitophagy failure phenotype supported by a significant increase of LC3-II level, and of LC3-II/LC3-I ratio (Fig. 6f, g) associated with unchanged or enhanced p62 (Fig. 6f, g), unchanged PINK1 and Parkin (Fig. 6f, h), enhanced TOMM20, TIMM23, and increase or unchanged HSP10 (Fig. 6f, i). We further showed unchanged levels of Parkin in control and C99-expressing cells treated with γ -secretase inhibitor by immunofluorescence (Suppl. Figure 8d, online resource). Using Cox8-EGFP-mCherry probe, we then demonstrated basal mitophagy defect upon C99 expression or accumulation (Fig. 6j), and revealed as observed in APPsw cells enhanced DFP-induced mitochondria targeting to lysosomal compartment in both control and C99 cells (Fig. 6j).

Interestingly, we also observed unchanged basal autophagy (LC3-I, LC3-II, and p62 levels), mitophagy priming (PINK1, and Parkin), and mitochondrial proteins levels (TOMM20, TIMM23, HSP60, and HSP10) in β -secretase inhibitor-treated APPsw cells, further demonstrating the deleterious effect of accumulated APP-CTFs independently from A β on mitophagy failure phenotype (Suppl. Figure 3j, online resource). Overall, these data consistently demonstrate that the accumulation of both endogenous and overexpressed APP-CTFs impaired basal mitophagy.



Mitochondrial structure alterations in AD mice models are linked to APP-CTFs accumulation but independently of A β

We already reported early and progressive APP-CTFs accumulation in the subiculum of 3xTgAD mice model [43], and showed that in vivo treatment of young 3xTgAD mice with

the γ -secretase inhibitor enhances APP-CTFs accumulation and triggers massive increases in endosome autophagic lysosomes (EAL) accumulation [45]. We took advantage of this model to examine the impact of APP-CTFs accumulation on mitochondrial structure and mitophagy in vivo. Young mice (aged 5 months) were treated daily for 1 month with γ -secretase inhibitor and analyzed for APP-CTFs' expression/

Fig. 4 Overexpressed C99 localizes to mitochondria and leads to mitochondrial function alterations. **a** SDS-PAGE of doxycycline-induced (10 $\mu\text{g/ml}$, 24 h) or control pSBtet SPC99-transfected SH-SY5Y cells treated with vehicle (–) or with γ -secretase inhibitor (+) (γ -sec inh; 5 μM , 20 h). Full-length APP (APP), C99, and C83 were detected in mitochondrial-enriched fraction using APP-Cter antibody. **b** Quantification of C99 and C83 levels in mitochondrial fraction presented as means \pm SEM versus C99 cells treated with vehicle (–) (taken as 100%) and obtained in four independent experiments. **c** Immunostaining of SH-SY5Y C99 and control cells treated as in (a) with APP-Cter (green) and HSP60 (red) antibodies. Images show merge of green and red signals reflecting the colocalization in yellow. Nuclei were labeled with DAPI. Scale bars represent 10 μm . **d** SDS-PAGE of C99 and C83 and of mitochondrial OXPHOS subunits obtained in total extracts of HEK cells transiently transfected with either pcDNA3.1 (control) or C99 cDNA. Actin was used as loading control. **e** Complex I-NDUFB8 subunit expression presented as means \pm SEM ($n=5$) versus control (taken as 100%). **f** Spectrophotometric analysis of complex I activity in HEK cells transfected as in (d) and expressed as means \pm SEM ($n=4$) of absolute values in nanomols of substrate/min/mg of proteins. Graphs representing Mitox (g) or TMRM (h) median intensities obtained by FACS analyses in control and C99 cells treated as in (a). Median fluorescence intensities are expressed as means \pm SEM ($n=3$ in triplicates) versus control treated with vehicle (–) (taken as 100%). **i** Caspase 3-like activity was assessed under basal condition and STS stimulation (1 μM , 2 h) in cells treated as in (a). The graph represents means of fluorescence intensity (Fluorescence units (FU)/mg protein/h) \pm SEM ($n=2$ in triplicates). **b** $**P<0.01$, $***P<0.001$ using Kruskal–Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test. **e**, **f** $**P<0.01$, $***P<0.001$ versus control using t test. **g–i** $*P<0.05$, $**P<0.01$, $****P<0.0001$ and ns: non-significant using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test

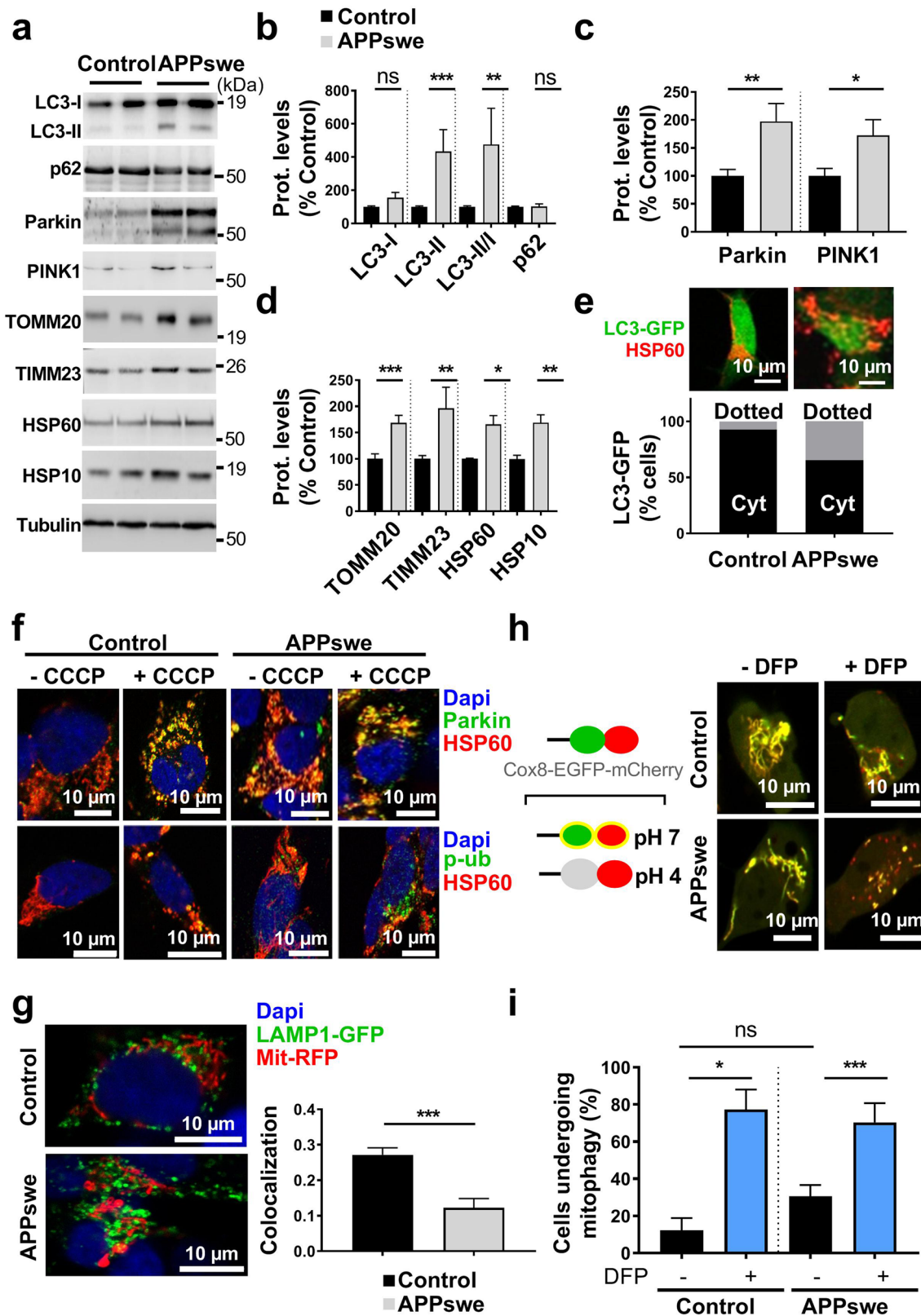
accumulation in mitochondria-enriched fraction. We first show the presence of APP-CTFs in mitochondria of 3xTgAD but not WT mice hippocampi (Fig. 7a). γ -secretase inhibitor unravels APP-CTFs accumulation in WT mice and drastically enhanced it in 3xTgAD mice (Fig. 7a). Mitochondria morphology and size were then analyzed by electron microscopy in the subiculum area of WT and 3xTgAD mice treated with vehicle or with γ -secretase inhibitor (Fig. 7b–e). We constrained our classification in vivo to two mitochondria classes, where class I corresponds to mitochondria with uniform matrix filled with dense packed regular distributed cristae, and class II corresponds to mitochondria showing morphological abnormalities, ranging from focal loss of cristae with empty spaces to severe loss of cristae and matrix (corresponding to mitochondria classes II and III in cells). We did not observe swollen mitochondria class IV in vivo. We first show that vehicle-treated WT and 3xTgAD mice harbor 91% and 79% of class I mitochondria, respectively (Fig. 7c and suppl. Table 3, online resource). Thus, 3xTgAD mice did not show noticeable early alteration of mitochondria cristae shape. However, we observed that mitochondria of 3xTgAD mice harbor a significant reduction of perimeter and area as compared to wild-type mice (Fig. 7d, e and suppl. Table 3, online resource). Importantly, the treatment with γ -secretase inhibitor dramatically and significantly lowered the percentage of class I mitochondria to

19%, and 52%, and enhanced the percentage of class II mitochondria that reached 81% and 48% in 3xTgAD and WT mice respectively (Fig. 7b, c and suppl. Table 3, online resource). γ -secretase inhibitor treatment also enhanced mitochondria perimeter and area in 3xTgAD mice without affecting that of WT mice (Fig. 7d, e and suppl. Table 3, online resource). To confirm that C99 accumulation per se also impacts mitochondria morphology and size in vivo; we compared young (aged 2–3 months) and old (aged 12 months) adeno-associated-virus (AAV)-C99 injected mice previously described [45]. Immunofluorescence analyses using APP-Cter antibody showed intraneuronal expression of C99 in the cortex and the subiculum (Sub) and dentate gyrus (DG) regions of the hippocampus of AAV-C99 injected mice (Fig. 8a). C99 expression was detectable in mitochondrial fractions isolated from both young and old AAV-C99 mice brains (Fig. 8b) and only faintly detectable in AAV-Free-injected mice (Fig. 8b). This observation was corroborated by demonstrating the colocalization of C99 (using APP-Cter antibody) with mitochondrial TIMM23 protein (Fig. 8c). We analyzed mitochondrial morphology in the cell body of cortical neurons and revealed a large number of mitochondria class I in young and old control mice (91% and 96% respectively). In contrast, we noticed a reduction of mitochondria class I in both young and old AAV-C99 injected mice (47% and 52%, respectively) with concomitant increases in class II mitochondria (53% and 48%, respectively) (Fig. 8d, e and suppl. Table 3, online resource). In AAV-C99-injected mice, C99 is also expressed in the hippocampus (Fig. 8a and suppl. Figure 10a, online resource), and triggers reduced class I mitochondria in the cell body of hippocampal neurons (Suppl. Figure 10b, c, online resource). Interestingly, we observed unchanged mitochondria size (area and perimeter) in AAV-C99 versus AAV-Free young mice (Suppl. Figure 10b, d, and e, online resource), but significantly increased size in AAV-C99 old mice as compared to their age-matched control mice (Fig. 8f, g).

The similar data obtained in γ -secretase inhibitor-treated 3xTgAD mice (Fig. 7a–e) and AAV-C99 mice (Fig. 8a–g and suppl. Figure 10b–e, online resource) fully demonstrate that APP-CTFs accumulate in mitochondria and induce early and age-dependent mitochondrial structure alterations.

Basal mitophagy failure in AD mice models is associated with APP-CTFs accumulation

The analysis of mitophagy marker expressions showed enhanced mitochondrial LC3-I and LC3-II and unchanged p62 levels in 3xTgAD mice than in WT mice reflecting both basal autophagy induction (conversion of LC3-I- to LC3II) and impairment of autophagy degradation (LC3-I, LC3-II accumulation and unchanged p62 level) (Fig. 7f, g). Since at 5-month age, 3xTgAD mice display high APP-CTFs levels, while A β remained barely detectable [11], we



may assume that mitophagy failure is rather associated with APP-CTFs accumulation. Corroborating this statement, we observed increase of LC3-I level and of LC3-II/LC3-I ratio,

unchanged p62 level in 3xTg-AD versus WT mice treated with γ -secretase inhibitor (Fig. 7f, g). Accordingly, old but not young AAV-C99-injected mice showed basal autophagy

Fig. 5 SH-SY5Y cells expressing APP_{swe} display mitophagy failure phenotype. **a** SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), Parkin, PINK1, TOMM20, TIMM23, HSP60, and HSP10 in mitochondria-enriched fraction of SH-SY5Y cells stably transfected with pcDNA3.1 empty vector (control) and APP_{swe} construct. Tubulin was used as loading control. **b–d** Quantitative graphs of indicated proteins expressed as means ± SEM ($n=3–4$ in duplicates) versus control (taken as 100%). **e** Representative images of control and APP_{swe} cells transiently transfected with LC3-GFP reporter (Green) stained with anti-HSP60 (Red). Scale bar represents 10 μm. The graph represents percentage of cells ($n=20–30$) harboring cytosolic diffuse LC3-GFP signal (Cyt), or aggregated LC3-GFP signal (dotted yellow signal reflecting the colocalization of LC3-GFP and HSP60). **f** Immunostaining of control and APP_{swe} cells treated with vehicle (– CCCP) or with CCCP (+) (1 μM, 6 h) and stained with anti-Parkin or anti-phospho-poly-ubiquitin (p-S65-Ub: p-Ub) (green) and anti-HSP60 (red). **g** Representative images of control and APP_{swe} cells transfected with LAMP1-GFP probe (green) and Mit-RFP probe (red). The graph shows the colocalization (Mander's coefficient) of Mit-RFP with LAMP1-GFP, means ± SEM of $n=14$ cells. **f, g** Nuclei were labeled with DAPI. Images show merge of green and red signals reflecting the colocalization in yellow. Scale bars represent 10 μm. **h** Scheme of Cox8-EGFP-mCherry mitophagy reporter construct (left). Representative images of vehicle- (–) or deferiprone (DFP)- (+) (1 mM, 20 h) treated control and APP_{swe} cells transiently transfected with Cox8-EGFP-mCherry probe (Right). **i** Graph represents percentage of cells (Means ± SEM of $n=55–130$ cells) undergoing mitophagy (cells with fragmented and red mitochondria reflecting the mCherry signal only due to EGFP signal quenching at pH4). **b–d, g** * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and ns: non-significant versus control using Mann–Whitney test. **i** * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, and ns: non-significant using Kruskal–Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test

induction and defective autophagy degradation (LC3-I, LC3-II accumulation and unchanged p62 level) (Fig. 8h, i). In agreement with defective degradation of dysfunctional mitochondria, we noticed unchanged level of the mitophagy priming protein PINK1 in mitochondria fraction of vehicle- or with γ -secretase inhibitor-treated 3xTgAD mice (Fig. 7f, h), and enhanced HSP10 protein level in 3xTg-AD mice versus WT mice (Fig. 7f, h), and observed a significant enhancement of TIMM23, HSP10, and MFN2 protein levels in 3xTg-AD versus WT mice treated with γ -secretase inhibitor (Fig. 7f, h). These data fully demonstrate that APP-CTFs accumulation triggers mitophagy failure in vivo.

Mitochondria structure alterations and mitophagy are differently impacted by late-stage A β and APP-CTFs accumulation in AD mice models

To delineate the respective contribution of APP-CTFs and A β to mitochondrial structure and mitophagy defects, we compared 3xTg-AD and 2xTg-AD mice. Thus, while both AD models accumulate APP-CTFs similarly, only 3xTg-AD animals produce A β (at late age) that remains always barely detectable in 2xTg-AD mice [11]. In fact, we confirmed similar APP-CTFs accumulation in mitochondria-enriched fractions from both 2xTg-AD and 3xTg-AD and noticeable

absence of A β peptide in 2xTgAD mice (Fig. 9a). We also confirmed the presence of large amyloid plaques (AP) surrounded by dystrophic neurites (DN) in the subiculum of 3xTg-AD mice but not in 2xTg-AD mice [Fig. 9b, image 3xTg-AD (")]. Interestingly, electron microscopy analyses revealed that while old WT mice display equal proportions of classes I and II mitochondria, both old 2xTgAD and 3xTgAD mice display a higher population of class II mitochondria (81% and 82%, respectively) (Fig. 9c and suppl. Table 3, online resource) and significant increases in mitochondria perimeter (Fig. 9d and suppl. Table 3, online resource) and area (Fig. 9e and suppl. Table 3, online resource). These data demonstrate that mitochondria structure alteration in old mice is triggered by the accumulation of APP-CTFs independently of A β and pTau (accumulating in old 3xTg-AD but not in 2xTg-AD mice [11]) (Fig. 9b–e).

Mitophagy analyses revealed in old 3xTgAD mice reduced LC3-I level, unchanged LC3-II level, and enhanced LC3-II/LC3-I ratio (Fig. 9f, g). In accordance, with active mitophagy, old 3xTgAD mice showed reduced p62 (Fig. 9f, g), enhanced PINK1 (Fig. 9f, h), and reduced levels of TIMM23 and MFN2 (Fig. 9f, h). We also noticed reduction trends of HSP10 and DRP1 proteins, but that did not reach statistical significance (Fig. 9f, h). Unlike 3xTgAD mice, 2xTgAD mice harbor a mitigate mitophagy phenotype showing reduced LC3-I, unchanged LC3-II levels and LC3-II/LC3-I ratio (Fig. 9f, g), unchanged p62 (Fig. 9f, g), and enhanced PINK1 and a slight reduction of TIMM23 but not of HSP10, MFN2, or DRP1 (Fig. 9f–h). Altogether, these results pinpointed a late-stage contribution of A β and pTau to mitophagy induction in old 3xTgAD mice (Fig. 9f–h), while early APP-CTFs accumulation accounts for impaired mitophagy in young 3xTgAD (Fig. 7f–h) and old 2xTgAD mice (Fig. 9f–h). The specific contribution of A β versus pTau to mitophagy activation in old 3xTg-AD mice needs a dedicated study.

Correlation between basal mitophagy failure and APP-CTFs accumulation in human AD brains

We lastly questioned whether APP-CTFs accumulate in human SAD brains and investigated the potential correlation between APP-CTFs levels in mitochondria and mitophagy markers. The presence and accumulation levels of APP-CTFs were explored in mitochondria-enriched fraction of a large human SAD brains cohort (patients' information in suppl. Table 1, online resource). We observed unchanged level of full-length APP (Fig. 10a, b), and enhanced C83 and C99 expressions (Fig. 10a, c–e) in AD brains using the two sets of antibodies APP-Cter and 82E1 (directed to the first and free aa residue of A β and C99) (Fig. 10a, d, e). In this cohort, we also revealed a positive and significant correlation between C99 level

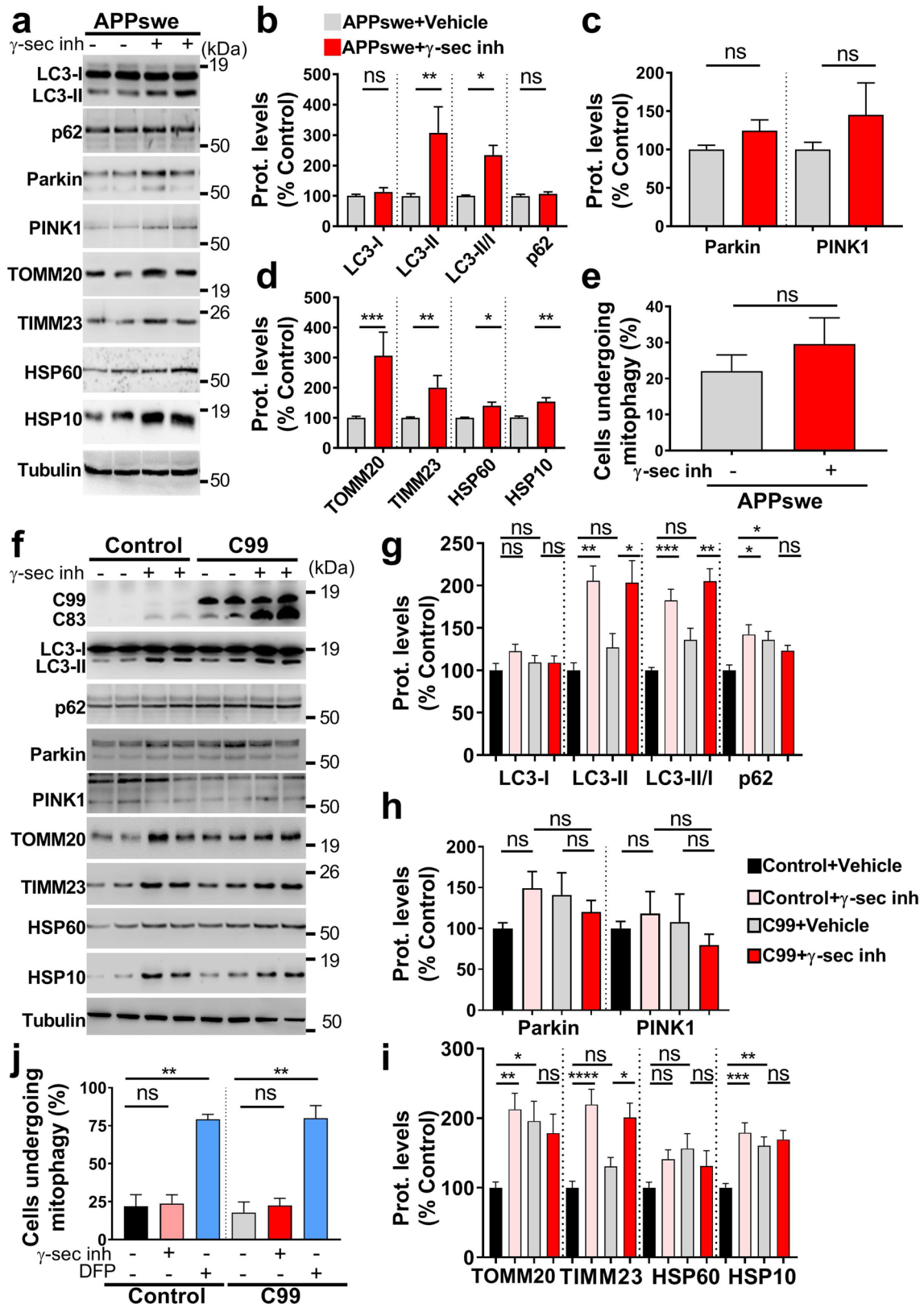


Fig. 6 APP-CTFs accumulation/overexpression triggers mitophagy failure in cells. **a** SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), Parkin, PINK1, TOMM20, TIMM23, HSP60, and HSP10 in mitochondria-enriched fraction of SH-SY5Y APP^{swe} cells treated with vehicle (–) or with γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (+) (5 μ M, 20 h). **b–d** Quantitative graphs of indicated proteins expressed as means \pm SEM ($n=4–6$ in duplicates) versus APP^{swe} cells treated with vehicle (taken as 100%). **e** Graph represents percentage of cells (Means \pm SEM of $n=130$) undergoing mitophagy (analyzed as in Fig. 5h). **f** SDS-PAGE of C99, C83, LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), Parkin, PINK1, TOMM20, TIMM23, HSP60, and HSP10 in mitochondria-enriched fraction of SH-SY5Y control and C99 cells as described in Fig. 4a. **g–i** Quantitative graphs of indicated proteins expressed as means \pm SEM versus control cells (+ vehicle) (taken as 100%) ($n=4–5$ in duplicates). **j** Graph represents percentage of cells (Means \pm SEM of $n=70–80$) undergoing mitophagy (analyzed as in Fig. 5h). DFP was used a positive control. **a, f** Tubulin was used as loading control. **b–e** $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, and *ns* non-significant versus control using Mann–Whitney test. **g–i** $*P<0.05$, $**P<0.01$, $***P<0.001$, and *ns* non-significant using one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison post-test. **j** $**P<0.01$, and *ns*: non-significant using Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison post-test

and total A β load (Fig. 10f). Using immunohistochemistry and antigen retrieval approaches [16], we revealed in AD brain slices (patients information in suppl. Table 1, online resource) intracellular APP-CTFs and A β membranous-like signal (Fig. 10g, inserts b, d), in parallel to extracellular APP-CTFs’ aggregates and focal amyloid plaques, respectively, detected with APP-Cter and 82E1 antibodies (Fig. 10g, inserts a, c). We investigated in the same brain cohort mitophagy markers (LC3-I, LC3-II, P62, Parkin, and PINK1) expression in mitochondria-enriched fractions (Fig. 10h–n). Interestingly, we showed a significant increase of LC3-II/LC3-I and enhanced p62 level in AD brains as compared to controls (Fig. 10h, i). Supporting mitophagy priming failure, we also revealed a consistent reduction of PINK1 and Parkin proteins (Fig. 10h, j). Importantly, expression of all these markers significantly correlated with mitochondrial C99 level (Fig. 10k–n). Since our AD cohort shows elevated expression levels of A β (Fig. 10a, f) and pTau (Suppl. Figure 11e, online resource), we also analyzed the potential correlation of mitophagy markers expression with A β and pTau levels. Intriguingly, we noticed a significant negative correlation of total A β load with Parkin (Suppl. Figure 11c, online resource), but not with LC3-II/LC3-I, p62 and PINK1 (Suppl. Figure 11a, b, and d, online resource). We also observed a positive correlation of pTau with LC3-II/LC3-I ratio (Suppl. Figure 11f, online resource), but not with the other markers (Suppl. Figure 11 g–i, online resource). These data are in agreement with previous studies, showing that Parkin trigger intracellular A β 42 clearance [12] and the colocalization of pTau with LC3 in FAD brains [65]. Overall, these data firmly emphasize a

strong correlation between APP-CTFs accumulation and defective mitophagy phenotype in human AD brains, thus supporting our findings in various cellular and mice AD models.

Discussion

We report that APP-CTFs accumulation triggers mitochondrial dysfunctions and mitophagy failure in an A β -independent manner in various AD study models. This was demonstrated by studying a familial AD mutation known to enhance APP-CTFs production and by pharmacological blockade of γ -secretase that increases APP-CTFs recovery and impairs A β and AICD productions as well as by the study of models overexpressing C99 fragment. Consistent alterations were observed in cellular and in vivo mice models as well as in SAD-affected brains.

Several studies show that the β -secretase-derived APP-CTF is neurotoxic per se [38, 45, 58, 85]. Furthermore, transgenic mice expressing C99 fragment (C100-Tg) or stereotaxically injected with purified APP- β CTF (C100) into the brain show neuronal degeneration in the hippocampus, cortical atrophy, astrogliosis, reduced LTP, and behavioral deficits [6, 52–54]. These phenotypes have also been observed in wild-type or transgenic APP mice models after treatment with γ -secretase inhibitors [7, 52], and were amplified in C100-Tg mice harboring familial AD mutation [10]. Accordingly, we reported early, age-dependent, and hippocampus-specific accumulation of C99 in 3xTgAD mice model [43], and demonstrated that C99 accumulation in mice (rather than A β) is associated with synaptic alterations, and apathy-like behavior [11, 45]. Our data led us to envision that APP-CTFs accumulation could trigger mitochondrial structure, function, and mitophagy alterations that are consistently observed in AD-affected brains, and thereby could contribute to AD development or progression. This hypothesis is supported by evidence that mitochondria structure, function, and position directly impact neuronal functioning, thus controlling synaptic plasticity, learning and memory [72].

First, we revealed that APP-CTFs accumulate in mitochondria-enriched fraction and colocalize with mitochondrial proteins in cells and mice AD models. This agrees well with previous studies, demonstrating that APP is associated with mitochondria in AD-affected neurons [2, 3], and that APP catabolites (i.e., A β , C99, and AICD) are present in mitochondria [15, 20, 21, 60, 61, 74]. Supporting APP targeting to mitochondria, mutants lacking a region that encompasses a 5-aa trans-membrane (TM) and 7-aa juxta-membrane (JM) regions exhibit decreased mitochondrial localization [81]. Our laboratory and another also recently demonstrated the presence of APP and its

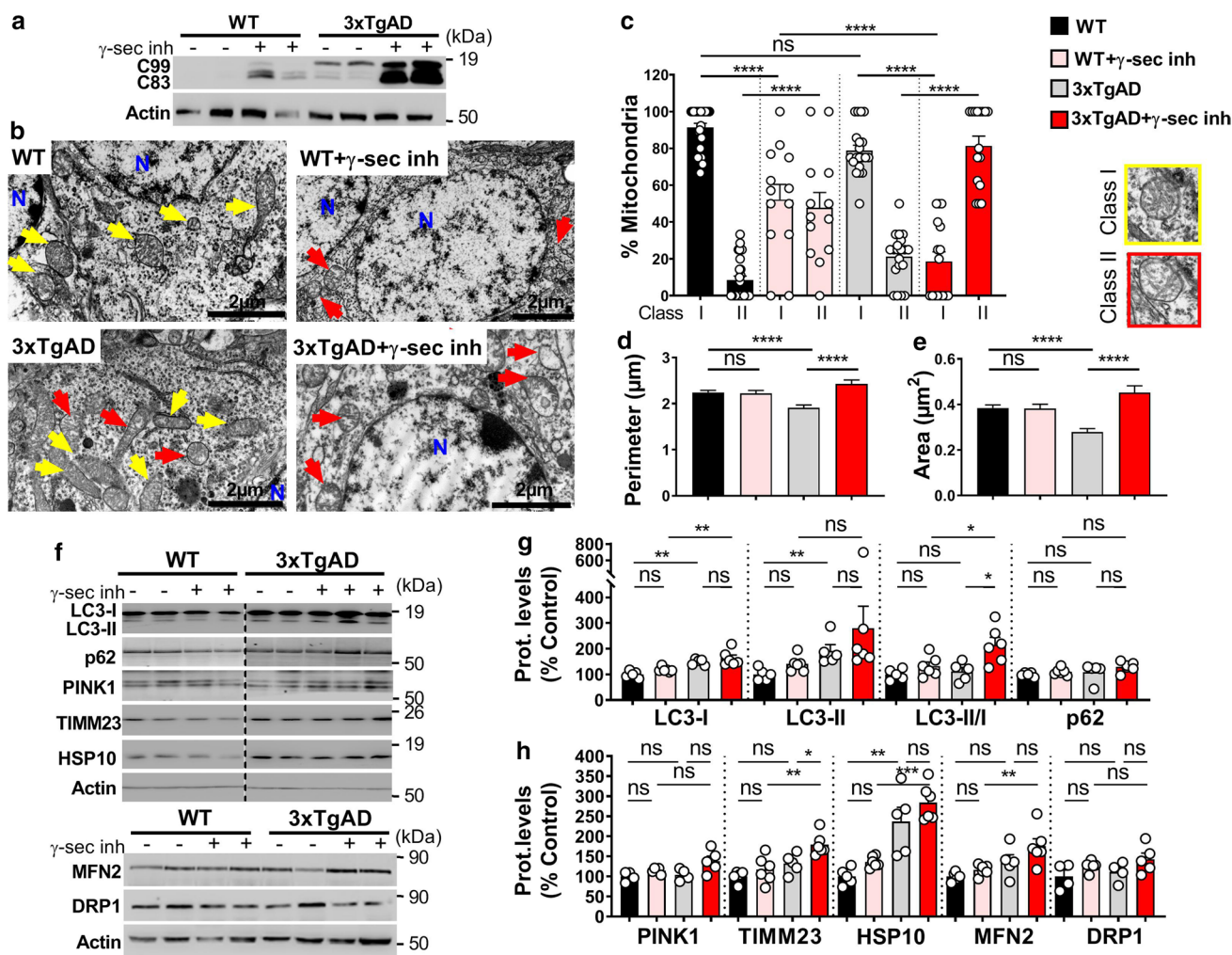


Fig. 7 APP-CTFs accumulate in mitochondria and trigger mitochondrial structure alteration and mitophagy failure in 3xTgAD mice. **a** SDS-PAGE of C99 and C83 expression detected using APP-Cter antibody in mitochondria-enriched fraction of hippocampi of 5-month-old wild-type (WT) or 3xTgAD females treated daily by oral gavage (for 1 month) with vehicle (methylcellulose/polysorbate 80) (-) or with γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (30 mg/kg) (+). **b** Electron microphotographs of neuronal soma of WT and 3xTgAD mice treated as in (a). N nucleus. Yellow and red arrows indicate mitochondria classes I or II shown in representative images in (c, right). Quantitative graphs of mitochondria classes I and II (c) and of the means \pm SEM of mitochondria perimeter (μ m) (d) and area (μ m²)

(e). **b–e** Data were obtained in two mice for each condition (> 20 analyzed field, > 100 of mitochondria). **f** SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), PINK1, TIMM23, HSP10, MFN2, and DRP1 in mitochondria-enriched fraction of hippocampi of WT and 3xTgAD mice treated as in (a). **g, h** Quantitative graphs of indicated proteins expressed as means \pm SEM versus WT mice (treated with vehicle) (taken as 100%) (WT+veh, $n=4-5$; WT+ γ -sec inh, $n=5-6$; 3xTgAD+veh, $n=4-5$; 3xTgAD+ γ -sec inh, $n=6$). **a, f** Actin was used as loading control. **c–e** **** $P < 0.0001$, and ns non-significant using Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison post-test. **g, h** * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and ns: non-significant using one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison post-test

derived fragments in mitochondria-associated membranes (MAMs) in sporadic and familial cellular and mice AD models [20, 63]. We also unraveled the presence and activity of β - and γ -secretases in MAMs, thus allowing APP processing in this microdomain [20]. Importantly, we demonstrate herein that APP-CTFs accumulation also occurs in mitochondria of human AD brains in agreement with previous studies showing enhanced BACE1 and β -secretase-derived APP-CTF levels in autosomal-dominant AD human brain total extracts [25, 62, 66].

Previous studies showed A β interaction with several mitochondrial proteins [82], and that A β triggers reduced activity of respiratory chain complexes [8, 24, 40]. In agreement with mitochondrial OXPHOS dysfunction and mitochondrial swelling (depicted as mitochondria type IV in cells), we noticed enhanced STS-induced caspase-3 activation in APP^{sw}-expressing cells that was reversed by both β -secretase and several γ -secretase inhibitors. This demonstrates that caspase-3 activation in APP^{sw} cells treated with STS is mostly contributed by A β but not by

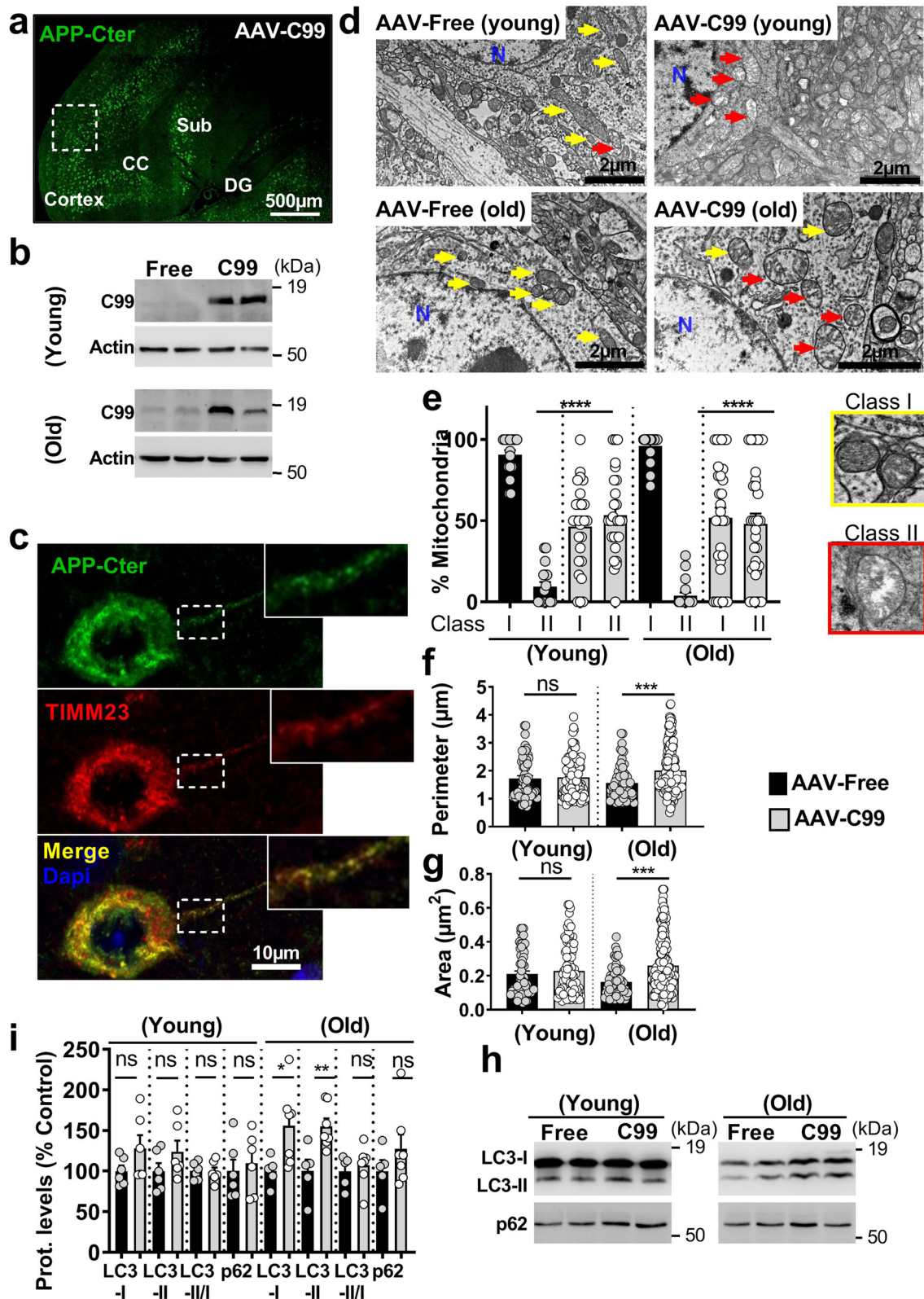
APP-CTFs. Conversely, we did not evidence STS-induced caspase-3 activation in C99-expressing cells likely attributable to different A β levels/subtypes produced in APPsw cells (A β 40 and A β 42 [59]) versus C99-expressing models (A β 40 [45]). Interestingly, mitochondrial ROS levels were enhanced in APPsw and C99-expressing cells, and potentiated by γ -secretase inhibitor in APPsw-expressing cells. Supporting this observation, APP-CTFs were also shown to enhance nitric oxide level in glial cells [67]. Several studies also reported that mitochondrial A β triggers ROS overproduction likely through complex I deficiency and/or interaction with antioxidant enzymes and that ROS increases in turn A β production [8, 48, 75]. These data led us to hypothesize that APP-CTFs, ROS, and A β may act in concert to accelerate disease progression.

We analyzed in depth mitochondrial structure in cellular and mice AD models using electron microscopy and high-resolution 3D imaging. We first described in APPsw cells large mitochondria with huge cristae disorganization (Fig. 1a, f and suppl. Table 3, online resource). Intriguingly, we revealed that γ -secretase inhibition-mediated APP-CTFs accumulation triggers a specific mitochondrial altered phenotype in cells. In contrast, β -secretase inhibition triggers a recovering of mitochondria class I morphology and a reduction of mitochondria classes II, III, and IV (Suppl. Figure 3d, e, online resource, and suppl. Table 3, online resource). These findings pinpointed the contribution of both A β and APP-CTFs accumulation to mitochondrial structure alterations observed in APPsw-expressing cells. Importantly, we also unraveled early mitochondrial morphology alteration, *in vivo*, in young 3xTgAD mice (5-month-old harboring APP-CTFs accumulation and not-detectable A β level) and further demonstrated an APP-CTFs-dependent (A β -independent) mitochondrial structure alteration in 3xTgAD mice treated with γ -secretase inhibitor (Fig. 7b, e and suppl. Table 3, online resource). Age- and APP-CTFs accumulation-dependent mitochondrial alterations were then confirmed in old AAV-C99-injected mice showing alteration of both morphology (cristae alteration) and increased size as compared to young AAV-C99-injected mice (Fig. 8d, g and suppl. Table 3, online resource). It is important to note that the alterations of mitochondria size (area and perimeter) were different between cellular models and AD mice brains (Fig. 7). These apparent discrepancies could be linked to APP metabolite levels/kinetic accumulation in these models. Another fundamental finding was obtained in aged (17 months) 2xTgAD (accumulating APP-CTFs but not A β) harboring similar mitochondrial structure alterations as observed in old 3xTgAD mice, thus further confirming that APP-CTFs accumulation triggers mitochondrial structure alterations independently of A β (Fig. 9 and suppl. Table 3, online resource). In accord with our findings, changes in mitochondrial morphology were reported in the

hippocampus of APP/PS1 dE9 mice at age 3 months before the onset of memory decline and A β deposition occurring by 6–9 months [83]. However, our data and others revealed that these mitochondrial structure phenotypes were not corroborated by consistent modulation of mitochondrial fission and fusion protein expression. Several studies reported imbalanced mitochondria fission/fusion in AD study models (cells expressing APP familial mutations or treated with A β , primary neurons from AD mice) and in human-derived fibroblasts and brains [30]. However, while mitochondrial fragmentation and abnormal distribution were generally described, the underlying molecular mechanisms are inconsistent between models [30, 49, 79, 88]. The variability in the exact molecular mechanisms underlying imbalanced fission/fusion observed in AD may emphasize the complexity of mitochondrial dynamics at different stages of the disease.

Inadequate mitophagy capacity in eliminating damaged mitochondria in AD-affected neurons likely contributes to AD development and/or progression. Recent datasets' analyses from healthy individuals and AD patients revealed a strong correlation between mitophagy and AD [76]. Several studies also highlighted defective mitophagy *in vitro* and *in vivo* linked to A β and pTau [17, 35, 50, 69]. We demonstrate herein defective mitophagy phenotypes in both cellular and AD mice models. Importantly, the use of APPsw and C99 cells treated with γ -secretase inhibitor supported the link between APP-CTFs accumulation and mitophagy failure phenotype that we further confirmed by the reduced/ or unchanged colocalization/targeting of mitochondria with/ to lysosomes. We also delineated that mitophagy blockade occurs at different steps of the process in our cellular models. Thus, while PINK1-Parkin pathway was activated in APPsw-expressing cells, it was abrogated in C99-expressing cells and upon γ -secretase inhibitor treatment-mediated APP-CTFs accumulation. Importantly, we confirmed defective mitophagy priming in young 3xTgAD mice treated with γ -secretase inhibitor. All together, our data suggest “abortion” of mitophagic process in both cellular and AD mice models, since we observed basal autophagy induction and inefficient mitochondrial protein degradation.

Concerning the molecular mechanisms, we recently demonstrated a transcriptional regulation of PINK1 by AICD in a PS1-dependent manner [31] and confirmed herein enhanced PINK1 expression and mitochondrial recruitment of Parkin in APPsw cells. PINK1 stabilization to mitochondria may likely also be attributable to mitochondrial potential depolarization observed in APPsw cells. Consistently, unchanged PINK1 expression in APPsw cells treated with γ -secretase inhibitor and in C99 cells is likely linked to: (1) unchanged or barely detectable AICD levels; and/ or (2) unchanged or enhanced mitochondrial membrane potential observed in these cellular models. Accordingly, we also observed unchanged Parkin level in both APPsw



cells treated with γ -secretase inhibitor and in C99 cells. We may also consider other molecular mechanisms impacting PINK1 expression in AD. Indeed, we recently reported

that nuclear p53-mediated repression of autophagy occurs through PINK1 gene transcriptional down regulation [32], and it is known that p53 levels are enhanced in AD brains

Fig. 8 Adeno-associated viral (AAV)-mediated expression of C99 in wild-type mice leads to APP-CTFs accumulation in mitochondria and triggers mitochondrial structure alteration and mitophagy failure phenotype. **a** Brain section of AAV-C99 injected (12-month-old) mice immunostained with APP-Cter antibody. Brain regions are depicted as cortex, corpus callosum (CC), subiculum (sub), and dentate gyrus (DG). Boxed cortex area represents region analyzed by electron microscopy. Scale bar represent 500 μm . **b** SDS-PAGE of C99 expression detected using APP-Cter antibody in mitochondria-enriched fraction of brains of AAV-Free (Free) or AAV-C99 (C99) injected mice aged 2–3 months (young) or 12 months (old). Actin was used as loading control. **c** Immunostaining of C99 neuronal expression in AAV-C99-injected mice (12 month-old) using APP-Cter antibody (green) and of mitochondria using TIMM23 antibody (red). Nuclei were labeled with DAPI. Higher magnification of boxed area represents axonal region. Colocalization of C99 and TIMM23 (yellow merged signal) is observed in soma and axon. Scale bar represent 10 μm . **d** Electron microphotographs of neuronal soma of young and old AAV-free and AAV-C99 mice. *N* nucleus. Yellow and red arrows indicate mitochondria class I or class II respectively shown in representative images in (e right). **e–g** Quantitative graphs of mitochondria classes I and II (e) and of the means \pm SEM of mitochondria perimeter (μm) (f), and area (μm^2) (g). **d–g** Data were obtained in 2–3 different mice in each condition (> 20 analyzed field, > 100 mitochondria). **h** SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, and SQSTM1/p62 (p62) in mitochondria-enriched fraction of brains of young and old AAV-free and AAV-C99 mice. **i** Quantitative graphs of indicated proteins expressed as means \pm SEM versus AAV-free mice (taken as 100%) (AAV-free mice young $n=6$, old, $n=5$; and AAV-C99 mice young $n=6$, and old, $n=7$). **e–g** $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$, and ns: non-significant using Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison post-test. **i** $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and ns non-significant versus respective AAV-free versus AAV-free mice using Mann–Whitney test

[37]. Intriguingly, we revealed late-stage mitophagy activation (LC3-II activation/accumulation, reduced p62, and mitochondrial protein degradation) in old 3xTgAD mice that was larger as compared to 2xTgAD mice likely pointing-out the contribution of late-stage A β accumulation and enhanced pTau to excessive mitochondrial degradation in AD. Corroborating this late-stage mitophagy activation, we also showed increased PINK1 expression in aged 2xTgAD and 3xTgAD (as we previously reported [31]).

Finally in our SAD cohort, we demonstrated a defective mitophagy phenotype (enhanced LC3-II/LC3-I and p62 and a reduction of Parkin and PINK1 expression) significantly correlating with enhanced C99 levels. Importantly, our data revealed a stronger correlation of mitophagy failure molecular signature with C99 as compared to A β or pTau. Clustered AV-like organelles and abnormal mitochondria with swollen shape and loss of cristae integrity were observed in neuronal perikarya of AD patient brains [86]. Impairment of mitophagy has also been observed in SAD fibroblasts due to diminished Parkin recruitment to mitochondria, accumulating depolarized mitochondria and PINK1 [51]. Reduced soluble Parkin and enhanced insoluble Parkin colocalizing with A β were also reported in AD brains [47]. Inconsistently, while Martin-Maestro et al. showed enhanced PINK1,

Parkin, and TOMM20 expressions [51], Ye et al. noticed a reduced cytosolic and increased mitochondrial Parkin levels in AD brains [86]. These discrepancies rather pointed out the complexity of a unique molecular pathway underlying mitophagy dysfunctions in human AD brains.

Our findings support a notion that enhanced LC3-II activation/accumulation associated with unchanged p62, inconsistent recruitment of PINK1/Parkin to mitochondria and elevated levels of mitochondrial proteins could be attributed to both induction of basal autophagy and defective clearance of autophagic substrates due to increased mitochondrial stress or dysfunction in AD neurons. Importantly, we and others demonstrated that APP-CTFs accumulation is associated with lysosomal–autophagic pathology in vitro and in vivo [36, 39, 41, 45, 53, 77]. Of most interest, a recent work based on either isogenic knockin human iPSCs or monogenic iPSCs carrying mutations on APP or PS1 demonstrated a C99-mediated and A β -independent alterations of the endolysosomal network [36, 39, 41, 45, 53, 77]. This importantly indicated that these phenotypic alterations could not be accounted for APP-CTFs overload linked to its overexpression. Furthermore, our laboratory and others also unraveled an amplifying loop where lysosomal–autophagic dysfunction trigger lysosomal APP-CTFs accumulation [5, 33, 45]. A recent study reported that mutated PS2 impairs autophagy by causing a block in the degradative flux at the level of the autophagosome–lysosome fusion step [27]. Accordingly, reduction of NRBF2 (nuclear receptor-binding factor 2) expression, a key component and regulator of the autophagy-associated PIK3C3-containing phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) complex, has been involved in APP-CTFs accumulation and defective autophagy [84]. All together, these evidences suggest that APP-CTFs accumulation triggers mitophagy alteration by interfering with different steps in mitophagic process likely occurring along stages of the disease development.

Several recent data support the relevance of enhancing mitochondrial proteostasis to delay AD pathogenesis. Notably, overexpression of Parkin improves its targeting to mitochondria and potentiates autophagic vesicle synthesis, and decreases the level of A β 42 and pTau [47, 51]. Accordingly, targeting proteostasis increases the fitness and lifespan of worms and reduces amyloid aggregation in cells, worms, and in transgenic mouse models of AD [76]. The contribution of A β -to-AD development has been questioned these last years, since all A β -centered therapeutic strategies (i.e., immunotherapy, or β - and γ -secretases inhibitors) failed to interfere with cognitive decline [78]. Our study highlights,

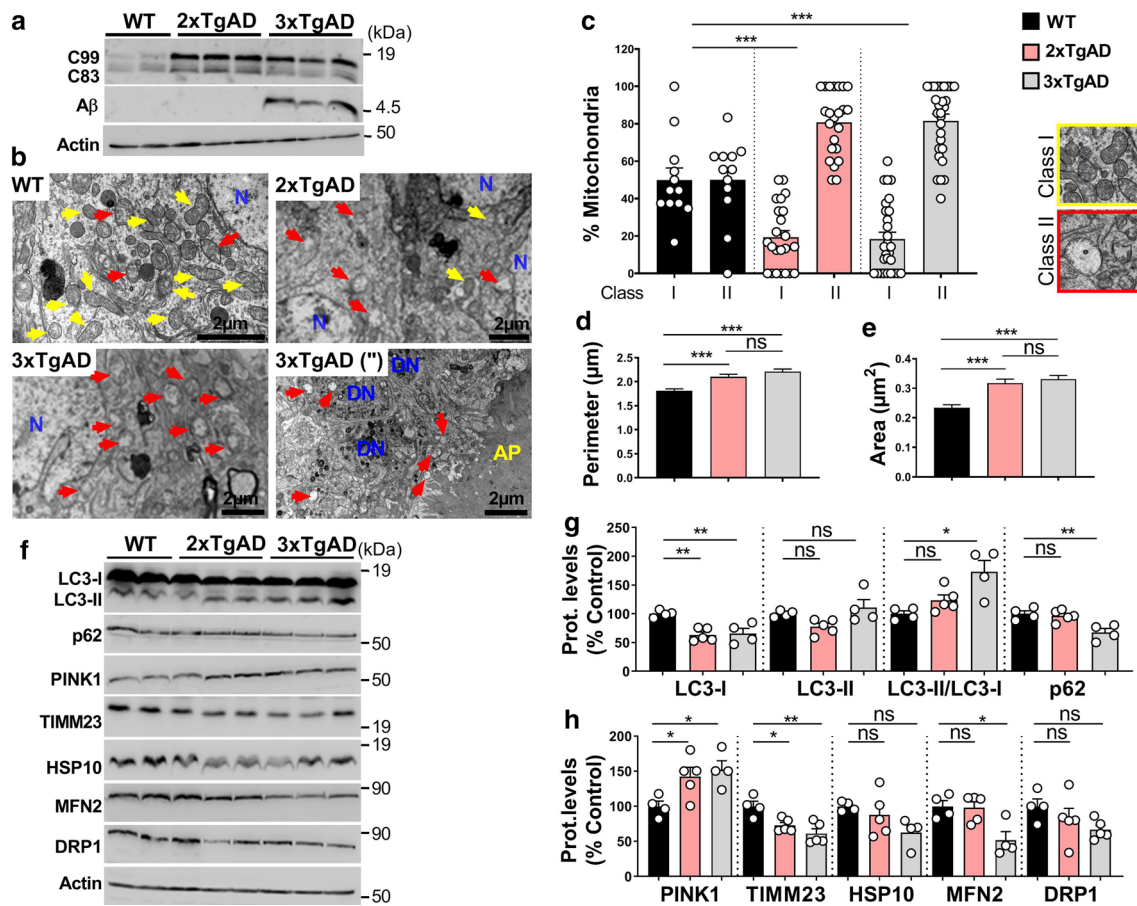


Fig. 9 Both APP-CTFs and A β contribute to mitochondrial structure and mitophagy alterations in old AD mice models. **a** SDS-PAGE of C99, C83, and A β expression in mitochondria-enriched fraction of hippocampi of 17 month-old wild-type (WT), 2xTgAD, and 3xTgAD males detected using 6E10 antibody. **b** Electron microphotographs of neuronal soma of WT, 2xTgAD, and 3xTgAD mice. 3xTgAD (") electron microphotograph represents amyloid plaque (AP) and dystrophic neuritis (DN). N nucleus. Yellow and red arrows indicate mitochondria classes I or II shown in representative images in (c right). **c–e** Quantitative graphs of mitochondria classes I, and II (c) and of the means \pm SEM of mitochondria perimeter (μ m) (d), and

area (μ m²) (e). **b–e** Data were obtained in two mice for each condition (>20 analyzed field, >100 mitochondria). **f** SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), PINK1, TIMM23, HSP10, MFN2, and DRP1 in mitochondria-enriched fraction of hippocampi of WT, 2xTgAD, and 3xTgAD mice. **a, f** Actin was used as loading control. **g, h** Quantitative graphs of indicated proteins expressed as means \pm SEM versus WT mice (taken as 100%) (WT, $n=4$; 2xTgAD, $n=5$; 3xTgAD, $n=5$). **c–e** $***P < 0.001$, and *ns* non-significant using Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparison post-test. **g, h** $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, and *ns* non-significant using one-way ANOVA and Tukey’s multiple comparison post-test

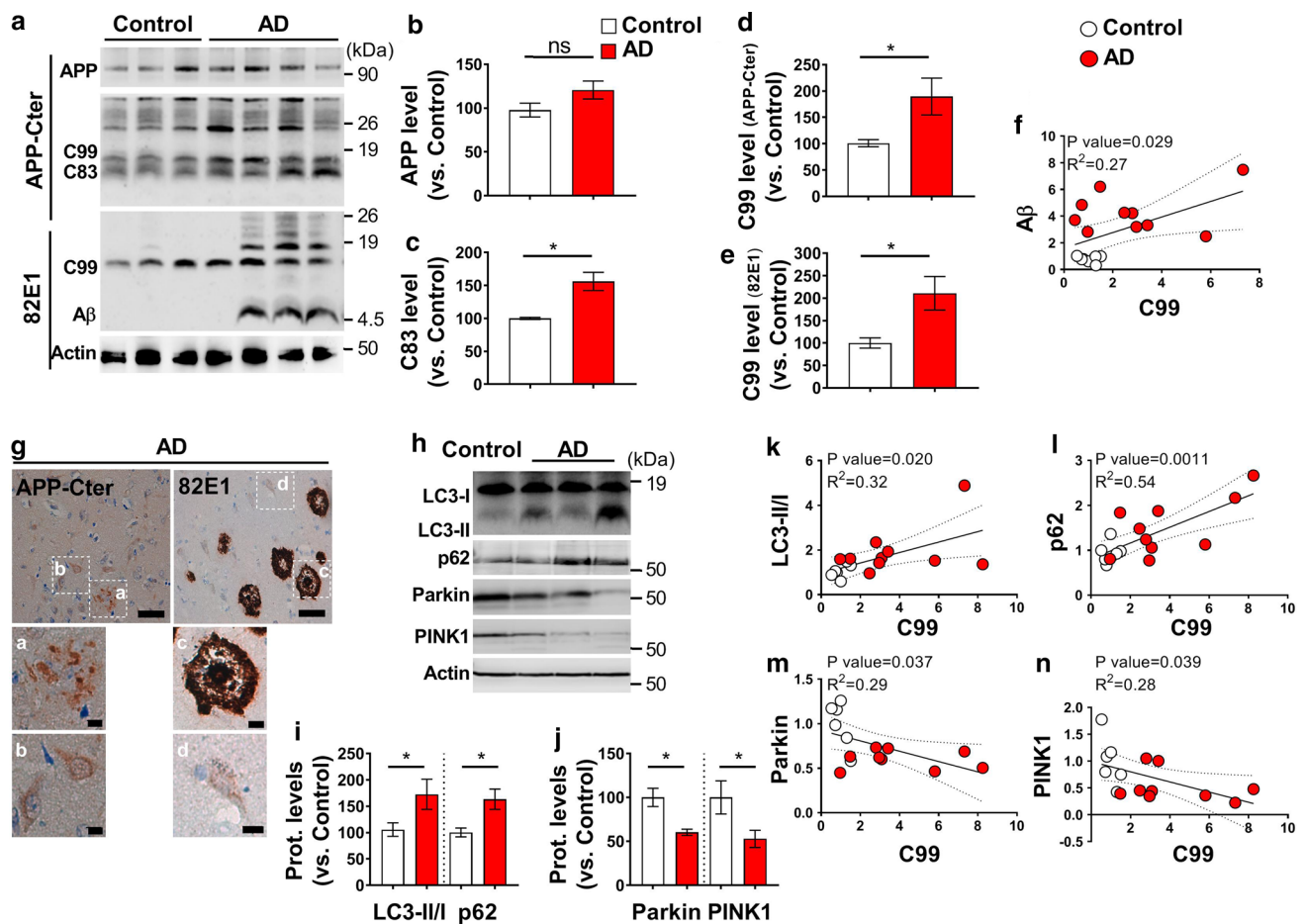


Fig. 10 APP-CTFs accumulate in SAD brains and are associated with basal mitophagy failure. **a** SDS-PAGE of full-length APP (APP), C99, C83, and A β expression in mitochondria-enriched fraction of temporal lobe of human control ($n=6-7$) and AD brains ($n=10-11$) (patients information in suppl. Table 1, online resource), revealed using APP-Cter (upper panel), and 82E1 (lower panel) antibodies. **b-e** Quantitative graphs of indicated proteins expressed as means \pm SEM versus controls (taken as 100%). **f** Correlation plots between A β and C99 levels including controls (white dots), and AD AD brain (T1 region of the temporal lobe) with APP-Cter and 82E1 antibodies. **g** Immunohistochemical staining of a human AD brain (T1 region of the temporal lobe) with APP-Cter and 82E1 antibodies. Higher magnification of boxed area represents extracellular aggregates and plaques (**a**, **c**), and intra-neuronal signal (**b**, **d**).

Scale bars represent 50 μ m and 10 μ m. Nuclei were stained with cresyl violet. **h-j** SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), Parkin, and PINK1 in mitochondria-enriched fraction of temporal lobe of human control (**h**), and quantitative graphs of indicated proteins (mean \pm SEM versus control taken as 100%) of control ($n=6-8$) and AD brains ($n=9-14$) (patients information in suppl. Table 1, online resource) (**i**, **j**). **a**, **h** Actin was used as loading control. **k-n** Correlation plots between C99 and LC3-II/I (**k**), p62 (**l**), Parkin (**m**), and PINK1 (**n**) levels in controls (white dots), and AD (red dots) brains. **f**, **k-n** Linear regression was used to determine P and goodness of fit (R^2) values. **b-e**, **i**, **j** $*P < 0.05$, and *ns* non-significant versus control using Mann-Whitney test

at least in part, the proven risk of using γ -secretase inhibitors as a therapeutic strategy in AD. It conversely unravels the potential interest of circumscribing APP-CTFs accumulation to recover mitochondrial structure and functions in AD. Alternatively, pharmacologically and genetically targeting mitochondrial function and mitophagy may also be a valuable strategy to treat or alleviate AD pathogenesis.

Acknowledgements This work was supported by Inserm (MC, and FC), Fondation Vaincre Alzheimer (Grant # FR18-035) (MC), Université Côte d'Azur (Living-systems-complexity-and-diversity) (MC), LABEX (excellence laboratory, program investment for the future), DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a

Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease) (FC and LB), the University Hospital Federation (FHU) OncoAge (FC), São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grant #2018/14289-6) (PFK). We acknowledge Ph.D. fellow support from research ministry to LVB. We acknowledge Ph.D. fellow support from DISTALZ to AM. We acknowledge the University's CCMA, Electron Microscopy facility supported by Université Côte d'Azur, the "Conseil Régional Sud Est PACA", the "Conseil Départemental 06" and Gis Ibisca, and we thank Alyssia Mari and Christelle Boscagli for technical help.

Author contributions MC conceived and designed the study, analyzed data, and wrote the manuscript. FC supports the project, discussed data, and edited the manuscript. LVB and AM participated to manuscript writing. RPP, FE, PFK, LB, and VBS edited the manuscript. LVB,

AM, FE, C. Badot, and MC conducted biochemistry, and mitophagy experiments in cellular models. LVB, JC, PFK, and MC conducted FACS experiments. RM and MC analyzed mitochondrial structure by confocal imaging. RB and CM participated to biochemistry and RT-PCR analyses. AM, and MC analyzed WT, 3xTgAD, 2xTgAD, and AAV-injected mice models and human brains. IL and MC prepared mice brains for electron microscopy. BO generated SH-SY5Y C99 stable cell line. RPP analyzed mitochondrial respiratory chain expression in C99-expressing cells, generated and analyzed AAV-C99 mice model. RPP, PFK, and MC analyzed mitochondrial structure in AAV-injected mice. C. Bauer maintained mice colonies. SLG, SP, conducted electron microscopy experiments. Mitochondrial respiratory chain function was performed in collaboration with KFM, and VPF.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest Authors declare no conflict of interest.

Ethical approval All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted. In vivo experiments were performed in accordance with the guidelines established by the European community council (Directive of November 24th, 1986), and approved by Nice university Animal care and use Committee, and the National Council on animal care of the Ministry of Health (Project n°: APAFIS#20495-201904231352370). All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical studies. Brain samples were obtained from the Brain Bank “NeuroCEB” run by a consortium of Patients Associations: ARSEP (association for research on multiple sclerosis), CSC (cerebellar ataxias), and France Parkinson. The consents were signed by the patients themselves or their next of kin in their name, in accordance with the French Bioethical (agreement AC-2013-1887). Cases were anonymized, but information was provided regarding sex, age at death, and neuropathology (Suppl. Table 1, online resource).

Informed consent Informed consent for tissue donation for research is obtained by the brain banks under their approval procedures.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Allen GF, Toth R, James J, Ganley IG (2013) Loss of iron triggers PINK1/Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep* 14:1127–1135. <https://doi.org/10.1038/embor.2013.168>
- Anandatheerthavarada HK, Devi L (2007) Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Neuroscientist* 13:626–638. <https://doi.org/10.1177/1073858407303536>
- Anandatheerthavarada HK, Devi L (2007) Mitochondrial translocation of amyloid precursor protein and its cleaved products: relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Rev Neurosci* 18:343–354. <https://doi.org/10.1177/1073858407303536>
- Area-Gomez E, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, Guardia-Laguarta C, de Groof AJ, Madra M et al (2012) Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J* 31:4106–4123. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.202>
- Asai M, Yagishita S, Iwata N, Saido TC, Ishiura S, Maruyama K (2011) An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. *FASEB J* 25:3720–3730. <https://doi.org/10.1096/fj.11-182154>
- Berger-Sweeney J, McPhie DL, Arters JA, Greenan J, Oster-Granite ML, Neve RL (1999) Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein. *Brain Res Mol Brain Res* 66:150–162. [https://doi.org/10.1016/s0169-328x\(99\)00014-5](https://doi.org/10.1016/s0169-328x(99)00014-5)
- Bittner T, Fuhrmann M, Burgold S, Jung CK, Volbracht C, Steiner H et al (2009) Gamma-secretase inhibition reduces spine density in vivo via an amyloid precursor protein-dependent pathway. *J Neurosci* 29:10405–10409. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2288-09.2009>
- Bobba A, Amadoro G, Valenti D, Corsetti V, Lassandro R, Atlante A (2013) Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by beta-amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* 13:298–311. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2013.03.008>
- Bolte S, Cordelieres FP (2006) A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc* 224:213–232. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2818.2006.01706.x>
- Boon WC, van den Buuse M, Wegener N, Martin S, Chua HK, Bush AI et al (2010) Behavioural phenotype of APPC100.V717F transgenic mice over-expressing a mutant Abeta-bearing fragment is associated with reduced NMDA receptor density. *Behav Brain Res* 209:27–35. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2010.01.013>
- Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, Bauer C, Checler F, Pardossi-Piquard R (2018) Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice. *Neurobiol Aging* 71:21–31. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.038>
- Burns MP, Zhang L, Rebeck GW, Querfurth HW, Moussa CE (2009) Parkin promotes intracellular Abeta1-42 clearance. *Hum Mol Genet* 18:3206–3216. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp258>
- Bussiere R, Lacampagne A, Reiken S, Liu X, Scheuerman V, Zalk R et al (2017) Amyloid beta production is regulated by beta2-adrenergic signaling-mediated post-translational modifications of the ryanodine receptor. *J Biol Chem* 292:10153–10168. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.743070>
- Checler F (1995) Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 65:1431–1444. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041431.x>
- Chen JX, Yan SS (2010) Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 20(Suppl 2):S569–S578. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100357>
- Christensen DZ, Bayer TA, Wirths O (2009) Formic acid is essential for immunohistochemical detection of aggregated intraneuronal Abeta peptides in mouse models of Alzheimer's


- disease. *Brain Res* 1301:116–125. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2009.09.014>
17. Cummins N, Tweedie A, Zuryn S, Bertran-Gonzalez J, Gotz J (2019) Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria. *EMBO J*. <https://doi.org/10.15252/embj.201899360>
 18. da Costa CA, Ancolio K, Checler F (2000) Wild-type but not Parkinson's disease-related α -53 \rightarrow Thr mutant alpha-synuclein protects neuronal cells from apoptotic stimuli. *J Biol Chem* 275:24065–24069. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002413200>
 19. De Strooper B, Karran E (2016) The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell* 164:603–615. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.12.056>
 20. Del Prete D, Suski JM, Oules B, Debayle D, Gay AS, Lacas-Gervais S et al (2017) Localization and processing of the amyloid-beta protein precursor in mitochondria-associated membranes. *J Alzheimers Dis* 55:1549–1570. <https://doi.org/10.3233/JAD-160953>
 21. Devi L, Ohno M (2012) Mitochondrial dysfunction and accumulation of the beta-secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis* 45:417–424. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.09.001>
 22. Duchen MR, Surin A, Jacobson J (2003) Imaging mitochondrial function in intact cells. *Methods Enzymol* 361:353–389
 23. Dunys J, Valverde A, Checler F (2018) Are N- and C-terminally truncated Abeta species key pathological triggers in Alzheimer's disease? *J Biol Chem* 293:15419–15428. <https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003999>
 24. Emmerzaal TL, Rodenburg RJ, Tanila H, Verweij V, Kiliaan AJ, Kozicz T (2018) Age-dependent decrease of mitochondrial complex II activity in a familial mouse model for Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 66:75–82. <https://doi.org/10.3233/JAD-180337>
 25. Evin G, Zhu A, Holsinger RM, Masters CL, Li QX (2003) Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *J Neurosci Res* 74:386–392. <https://doi.org/10.1002/jnr.10745>
 26. Falcon-Perez JM, Nazarian R, Sabatti C, Dell'Angelica EC (2005) Distribution and dynamics of Lamp1-containing endocytic organelles in fibroblasts deficient in BLOC-3. *J Cell Sci* 118:5243–5255. <https://doi.org/10.1242/jcs.02633>
 27. Fedeli C, Filadi R, Rossi A, Mammucari C, Pizzo P (2019) PSEN2 (presenilin 2) mutants linked to familial Alzheimer disease impair autophagy by altering Ca(2+) homeostasis. *Autophagy* 15:2044–2062. <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1596489>
 28. Fivenson EM, Lautrup S, Sun N, Scheibye-Knudsen M, Stevnsner T et al (2017) Mitophagy in neurodegeneration and aging. *Neurochem Int* 109:202–209. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2017.02.007>
 29. Flammang B, Pardossi-Piquard R, Sevalle J, Debayle D, Dabert-Gay AS, Thevenet A et al (2012) Evidence that the amyloid-beta protein precursor intracellular domain, AICD, derives from beta-secretase-generated C-terminal fragment. *J Alzheimers Dis* 30:145–153. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-112186>
 30. Flannery PJ, Trushina E (2019) Mitochondrial dynamics and transport in Alzheimer's disease. *Mol Cell Neurosci* 98:109–120. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2019.06.009>
 31. Goiran T, Duplan E, Chami M, Bourgeois A, El Manaa W, Rouland L et al (2017) Beta-amyloid precursor protein intracellular domain controls mitochondrial function by modulating phosphatase and tensin homolog-induced kinase 1 transcription in cells and in Alzheimer mice models. *Biol Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.04.011>
 32. Goiran T, Duplan E, Rouland L, El Manaa W, Lauritzen I, Dunys J et al (2018) Nuclear p53-mediated repression of autophagy involves PINK1 transcriptional down-regulation. *Cell Death Differ* 25:873–884. <https://doi.org/10.1038/s41418-017-0016-0>
 33. Gonzalez AE, Munoz VC, Cavieres VA, Bustamante HA, Cornejo VH, Januario YC et al (2017) Autophagosomes cooperate in the degradation of intracellular C-terminal fragments of the amyloid precursor protein via the MVB/lysosomal pathway. *FASEB J* 31:2446–2459. <https://doi.org/10.1096/fj.201600713R>
 34. Hauptmann S, Scherping I, Drose S, Brandt U, Schulz KL, Jendrach M et al (2009) Mitochondrial dysfunction: an early event in Alzheimer pathology accumulates with age in AD transgenic mice. *Neurobiol Aging* 30:1574–1586. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.12.005>
 35. Hu Y, Li XC, Wang ZH, Luo Y, Zhang X, Liu XP et al (2016) Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin. *Oncotarget* 7:17356–17368. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7861>
 36. Hung COY, Livesey FJ (2018) Altered gamma-secretase processing of APP disrupts lysosome and autophagosome function in monogenic Alzheimer's disease. *Cell Rep* 25(3647–3660):e3642. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.095>
 37. Jazvinscak Jembrek M, Slade N, Hof PR, Simic G (2018) The interactions of p53 with tau and Ass as potential therapeutic targets for Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 168:104–127. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2018.05.001>
 38. Jiang Y, Sato Y, Im E, Berg M, Bordi M, Darji S et al (2019) Lysosomal dysfunction in down syndrome is APP-dependent and mediated by APP-betaCTF (C99). *J Neurosci* 39:5255–5268. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0578-19.2019>
 39. Kaur G, Pawlik M, Gandy SE, Ehrlich ME, Smiley JF, Levy E (2017) Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein. *Mol Psychiatry* 22:981–989. <https://doi.org/10.1038/mp.2016.189>
 40. Kim SH, Vlkolinsky R, Cairns N, Lubec G (2000) Decreased levels of complex III core protein 1 and complex V beta chain in brains from patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Cell Mol Life Sci* 57:1810–1816. <https://doi.org/10.1007/pl00000661>
 41. Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy EA, 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 abeta. *Neuron* 104:1022. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.11.010>
 42. Lauritzen I, Becot A, Bourgeois A, Pardossi-Piquard R, Biferi MG, Barkats M et al (2019) Targeting gamma-secretase triggers the selective enrichment of oligomeric APP-CTFs in brain extracellular vesicles from Alzheimer cell and mouse models. *Transl Neurodegener* 8:35. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0176-6>
 43. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S et al (2012) The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci* 32:16243–16255. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012>
 44. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Becot A, Checler F (2019) Does intraneuronal accumulation of carboxyl-terminal fragments of the amyloid precursor protein trigger early neurotoxicity in Alzheimer's disease? *Curr Alzheimer Res* 16:453–457. <https://doi.org/10.2174/1567205016666190325092841>
 45. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M et al (2016) Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol* 132:257–276. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1577-6>
 46. Leuner K, Muller WE, Reichert AS (2012) From mitochondrial dysfunction to amyloid beta formation: novel insights into the

- pathogenesis of Alzheimer's disease. *Mol Neurobiol* 46:186–193. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8307-4>
47. Lonskaya I, Shekoyan AR, Hebron ML, Desforgues N, Algarzae NK, Moussa CE (2013) Diminished parkin solubility and colocalization with intraneuronal amyloid-beta are associated with autophagic defects in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis* 33:231–247. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-121141>
 48. Lustbader JW, Cirilli M, Lin C, Xu HW, Takuma K, Wang N et al (2004) ABAD directly links Abeta to mitochondrial toxicity in Alzheimer's disease. *Science* 304:448–452. <https://doi.org/10.1126/science.1091230>
 49. Manczak M, Calkins MJ, Reddy PH (2011) Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet* 20:2495–2509. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr139>
 50. Manczak M, Kandimalla R, Yin X, Reddy PH (2018) Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 27:1332–1342. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy042>
 51. Martin-Maestro P, Gargini R, Perry G, Avila J, Garcia-Escudero V (2016) PARK2 enhancement is able to compensate mitophagy alterations found in sporadic Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 25:792–806. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv616>
 52. Mitani Y, Yarimizu J, Saita K, Uchino H, Akashiba H, Shitaka Y et al (2012) Differential effects between gamma-secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J Neurosci* 32:2037–2050. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4264-11.2012>
 53. Mondragon-Rodriguez S, Gu N, Manseau F, Williams S (2018) Alzheimer's transgenic model is characterized by very early brain network alterations and beta-CTF fragment accumulation: reversal by beta-secretase inhibition. *Front Cell Neurosci* 12:121. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00121>
 54. Nalbantoglu J, Tirado-Santiago G, Lahsaini A, Poirier J, Goncalves O, Verge G et al (1997) Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 387:500–505. <https://doi.org/10.1038/387500a0>
 55. 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. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1347-2>
 56. Oddo S, Caccamo A, Shepherd JD, Murphy MP, Golde TE, Kaye R et al (2003) Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular A β and synaptic dysfunction. *Neuron* 39:409–421. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00434-3)
 57. Osellame LD, Blacker TS, Duchon MR (2012) Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 26:711–723. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2012.05.003>
 58. Oster-Granite ML, McPhie DL, Greenan J, Neve RL (1996) Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 16:6732–6741
 59. Oules B, Del Prete D, Greco B, Zhang X, Lauritzen I, Sevalle J et al (2012) Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J Neurosci* 32:11820–11834. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0875-12.2012>
 60. Pagani L, Eckert A (2011) Amyloid-Beta interaction with mitochondria. *Int J Alzheimers Dis* 2011:925050. <https://doi.org/10.4061/2011/925050>
 61. Pavlov PF, Wiehager B, Sakai J, Frykman S, Behbahani H, Winblad B et al (2011) Mitochondrial gamma-secretase participates in the metabolism of mitochondria-associated amyloid precursor protein. *FASEB J* 25:78–88. <https://doi.org/10.1096/fj.10-157230>
 62. Pera M, Alcolea D, Sanchez-Valle R, Guardia-Laguarta C, Colom-Cadena M, Badiola N et al (2013) Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol* 125:201–213. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1062-9>
 63. Pera M, Larrea D, Guardia-Laguarta C, Montesinos J, Velasco KR, Agrawal RR et al (2017) Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *EMBO J* 36:3356–3371. <https://doi.org/10.15252/embj.201796797>
 64. Pickles S, Vigie P, Youle RJ (2018) Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr Biol* 28:R170–R185. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>
 65. Piras A, Collin L, Gruninger F, Graff C, Ronnback A (2016) Autophagic and lysosomal defects in human tauopathies: analysis of post-mortem brain from patients with familial Alzheimer disease, corticobasal degeneration and progressive supranuclear palsy. *Acta Neuropathol Commun* 4:22. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0292-9>
 66. Pulina MV, Hopkins M, Haroutunian V, Greengard P, Bustos V (2020) C99 selectively accumulates in vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement* 16:273–282. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.002>
 67. Rah JC, Kim HS, Kim SS, Bach JH, Kim YS, Park CH et al (2001) Effects of carboxyl-terminal fragment of Alzheimer's amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide on the production of cytokines and nitric oxide in glial cells. *FASEB J* 15:1463–1465. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0724fe>
 68. Reddy PH, Beal MF (2008) Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends Mol Med* 14:45–53. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2007.12.002>
 69. Reddy PH, Yin X, Manczak M, Kumar S, Pradeepkiran JA, Vijayan M et al (2018) Mutant APP and amyloid beta-induced defective autophagy, mitophagy, mitochondrial structural and functional changes and synaptic damage in hippocampal neurons from Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 27:2502–2516. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy154>
 70. Robinson KM, Janes MS, Pehar M, Monette JS, Ross MF, Hagen TM et al (2006) Selective fluorescent imaging of superoxide in vivo using ethidium-based probes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15038–15043. <https://doi.org/10.1073/pnas.0601945103>
 71. Rojansky R, Cha MY, Chan DC (2016) Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife*. <https://doi.org/10.7554/eLife.17896>
 72. Rossi MJ, Pekkurnaz G (2019) Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Curr Opin Neurobiol* 57:149–155. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.02.001>
 73. Rustin P, Chretien D, Bourgeron T, Gerard B, Rotig A, Saudubray JM et al (1994) Biochemical and molecular investigations in respiratory chain deficiencies. *Clin Chim Acta* 228:35–51. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(94\)90055-8](https://doi.org/10.1016/0009-8981(94)90055-8)
 74. Schreiner B, Hedskog L, Wiehager B, Ankarcrona M (2015) Amyloid-beta peptides are generated in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *J Alzheimers Dis* 43:369–374. <https://doi.org/10.3233/JAD-132543>
 75. Sena LA, Chandel NS (2012) Physiological roles of mitochondrial reactive oxygen species. *Mol Cell* 48:158–167. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2012.09.025>
 76. Sorrentino V, Romani M, Mouchiroud L, Beck JS, Zhang H, D'Amico D et al (2017) Enhancing mitochondrial proteostasis

- reduces amyloid-beta proteotoxicity. *Nature* 552:187–193. <https://doi.org/10.1038/nature25143>
77. Tamayev R, D'Adamio L (2012) Inhibition of gamma-secretase worsens memory deficits in a genetically congruous mouse model of Danish dementia. *Mol Neurodegener* 7:19. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-7-19>
 78. van Dyck CH (2018) Anti-amyloid-beta monoclonal antibodies for Alzheimer's disease: pitfalls and promise. *Biol Psychiatry* 83:311–319. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2017.08.010>
 79. Wang X, Su B, Siedlak SL, Moreira PI, Fujioka H, Wang Y et al (2008) Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:19318–19323. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804871105>
 80. Wang X, Wang W, Li L, Perry G, Lee HG, Zhu X (2014) Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Biochim Biophys Acta* 1842:1240–1247. <https://doi.org/10.1016/j.bbdis.2013.10.015>
 81. Wang Y, Wu F, Pan H, Zheng W, Feng C, Wang Y et al (2016) Lost region in amyloid precursor protein (APP) through TALEN-mediated genome editing alters mitochondrial morphology. *Sci Rep* 6:22244. <https://doi.org/10.1038/srep22244>
 82. Wilkins HM, Swerdlow RH (2017) Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain Res Bull* 133:71–79. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.08.009>
 83. Xu LL, Shen Y, Wang X, Wei LF, Wang P, Yang H et al (2017) Mitochondrial dynamics changes with age in an APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroReport* 28:222–228. <https://doi.org/10.1097/WNR.0000000000000739>
 84. Yang C, Cai CZ, Song JX, Tan JQ, Durairajan SSK, Iyaswamy A et al (2017) NRBF2 is involved in the autophagic degradation process of APP-CTFs in Alzheimer disease models. *Autophagy* 13:2028–2040. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1379633>
 85. Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL (1989) Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 245:417–420. <https://doi.org/10.1126/science.2474201>
 86. Ye X, Sun X, Starovoytov V, Cai Q (2015) Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Hum Mol Genet* 24:2938–2951. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddv056>
 87. Yoo SM, Jung YK (2018) A molecular approach to mitophagy and mitochondrial dynamics. *Mol Cells* 41:18–26. <https://doi.org/10.14348/molcells.2018.2277>
 88. Zhang L, Trushin S, Christensen TA, Bachmeier BV, Gateno B, Schroeder A et al (2016) Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 6:18725. <https://doi.org/10.1038/srep18725>

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

Affiliations

Ioan Vaillant-Beuchot¹ · Arnaud Mary¹ · Raphaëlle Pardossi-Piquard¹ · Alexandre Bourgeois¹ · Inger Lauritzen¹ · Fanny Eysert¹ · Paula Fernanda Kinoshita^{1,2} · Julie Cazareth¹ · Céline Badot¹ · Konstantina Fragaki³ · Renaud Bussiere^{1,4} · Cécile Martin¹ · Rosanna Mary¹ · Charlotte Bauer¹ · Sophie Pagnotta⁵ · Véronique Paquis-Flucklinger³ · Valérie Buée-Scherrer^{6,7} · Luc Buée^{6,7} · Sandra Lacas-Gervais⁵ · Frédéric Checler¹ · Mounia Chami¹ 

¹ Institut of Molecular and Cellular Pharmacology, Laboratory of Excellence DistALZ, Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France

² Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil

³ Université Côte d'Azur, CHU, Inserm, CNRS, IRCAN, Nice, France

⁴ Department of Medicine, Burlington Danes Building, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College London, UK Dementia Research Institute, Du Cane Road, London W12 0NN, UK

⁵ Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), Parc Valrose, 06108 Nice, France

⁶ Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience and Cognition, Place de Verdun, 59045 Lille, France

⁷ Inserm UMR-S 1172, Laboratory of Excellence DistALZ, 'Alzheimer and Tauopathies', Bâtiment Biserte, rue Polonovski, 59045 Lille Cedex, France

Supplementary Materials and methods

Cells and treatments

Wild-type MEF cells or double invalidated for APP and APLP2 were provided by Dr U. Muller [2]. MEF cell lines were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% fetal calf serum, penicillin (100 U/ml) and streptomycin (50 µg/ml) and incubated at 37°C in a 5% CO₂ atmosphere. Human SH-SY5Y neuroblastoma cells (CRL-2266, ATCC) were cultured following manufacturer's instructions.

We used γ -secretase inhibitors DFK-167 (Millipore) at 10µM, and DAPT (N-[N-(3,5-Difluorophenacetyl)-L-alanyl]-S-phenylglycine t-butyl ester (Sigma, Aldrich) at 5µM for 20h. For mitophagy flux analysis, cells were treated with 1µM Antimycin A (Sigma,Aldrich) and 10µM Oligomycin A (Sigma,Aldrich) for 20h.

Quantitative real-time PCR

Total RNA was isolated using NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel) according to the manufacturer's protocol. Total RNA was extracted from cells using RNAeasy lipid tissue (Qiagen) according to the manufacturer's protocol. Complementary DNA (cDNA) was synthesized from 2 µg of total RNA and random primers using GoScript Reverse Transcription System kit (Promega). Target gene expression was analyzed by real time PCR using Corbett Rotor-Gene 6000 (Invitrogen) and SYBR Green (Roche Applied Sciences). Cycling parameters were as follows: 20 sec at 95 °C, 20 sec at 60 °C, and 20 sec at 72 °C for 55 cycles. Primer sequences: Drp1 (Forward 5'-TGGGCGCCGACATCA-3', Reverse 5'-GCTCTGCGTTCCCACTACGA-3'); Mfn1 (Forward 5'-GGCATCTGTGGCCGAGTT-3', Reverse 5'-ATTATGCTAAGTCTCCGCTCCAA-3'); and Mfn2 (Forward 5'-GCTCGGAGGCACATGAAAGT-3', Reverse 5'-ATCACGGTGCTCTTCCCATT-3'). Human Topoisomerase 1 (Forward 5'-CCCTGTACTTCATCGACAAGG-3', Reverse 5'-CCACAGTGTCCGCTGTTTC-3'), and human GAPDH (Forward 5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'; Reverse 5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3') were used as control gene.

Imaging analyzes.

For the analysis of the mitochondrial three-dimensional network, after loading with 10 nM Mitotracker red KRB/1 mM CaCl₂ at 37°C for 30 min, cells were placed in a thermostated chamber on the stage of a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems SA, France). Z-images were acquired with 63x objective, Mitochondrial objects number and volume were determined using 3D object Counter plugging [1].

Supplementary figure legends

Supplementary Figure 1 a mRNA levels (means \pm SEM, n=4) of DRP1, MFN1 and MFN2 in SH-SY5Y stably expressing pcDNA3.1 empty vector (control) and APPswe cDNA (APPswe). **b-e** SDS-PAGE (b, c) and quantitative graphs (d, e) of the means \pm SEM of MFN2, MFN1, and DRP1 expression levels in total cell extracts (n=4) (b, d) and mitochondrial-enriched fraction (n=5 in duplicates) (c, d) of control and APPswe cells. **f** Levels of complexes II-SDHB, III-UQCRC2, IV-COXII, and V-ATP5A subunits expression revealed using OXPHOS antibodies mix (see representative SDS-PAGE in Figure 1) and expressed as means \pm SEM (n=4) control (taken as 100%). **g-k** Spectrophotometric analysis of the respiratory chain complex II, III, IV, and V activities are expressed as absolute values in nanomols of substrate/min/mg of proteins and presented as means \pm SEM (n=3). Citrate synthase activity was analyzed to ascertain similar mitochondria content between control and APPswe expressing cells. **a, d-k** ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, and ns: non-significant versus control using Mann Whitney test.

Supplementary Figure 2 a Representative images of mitochondrial structure in SH-SY5Y cells expressing APPswe treated with vehicle or with γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (5 μ M, 20h). Scale bars correspond to 10 μ m. **b, c** Quantitative analyses of objects number (b), and volume (voxels) (c) expressed as means \pm SEM (n=3). **d** mRNA levels (means \pm SEM of four independent experiments) of DRP1, and MFN2 in APPswe treated as in (a). **e** SDS-PAGE and quantification (means \pm SEM, n=4) of mitochondrial MFN2, and DRP1 in APPswe treated as in (a). **b-e** * $P < 0.01$, and ns: non-significant versus vehicle-treated APPswe cells using Mann Whitney test.

Supplementary Figure 3 a SDS-PAGE (low and high exposures) of APP and its indicated metabolites (revealed as in Figure 2) in vehicle (-) or β -secretase inhibitor- (β -sec inh) (+) (30 μ M, 20h) treated APPswe cells revealed in total cell extracts (Tot), and mitochondrial-enriched fraction (Mit). Actin was used as loading control. **b, c** Quantitative graphs of indicated proteins in total extracts (b) and mitochondrial fraction (c) expressed as means \pm

SEM (n=4) versus vehicle-treated APP_{swe} cells (taken as 100%). **d** Electron microscopy ultrastructure of SH-SY5Y APP_{swe} treated as in (a). Scale bars correspond to 2 μ m. N: nucleus. Colored arrowheads indicate mitochondria classes as shown in Fig. 1b. **e** Quantitative graph of mitochondria classes obtained in duplicates (> 10 different fields, > 150 mitochondria). **f** SDS-PAGE and quantification of NDUFB8 expression (means \pm SEM, n=4) of vehicle-treated APP_{swe} cells (taken as 100%). **g** Spectrophotometric analysis of the respiratory chain complex I activity expressed as absolute values in nanomols of substrate/min/mg of proteins and presented as means \pm SEM, n=4. **h** TMRM median intensity obtained by FACS analyses. Data are expressed as means \pm SEM, n=5 of vehicle-treated APP_{swe} cells (taken as 100%). **i** Caspase 3-like activity under staurosporin stimulation (1 μ M, 2h) expressed as fluorescence intensity (Fluorescence units (FU)/mg protein/h) \pm SEM, n=5 in triplicates. **j** SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), Parkin, PINK1, TOMM20, TIMM23, and HSP10 in mitochondria-enriched fraction of APP_{swe} cells treated as in (a). Tubulin was used as loading control. **b, c** *** $P < 0.001$, and ns: non-significant using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test. **g-i** ** $P < 0.01$, versus vehicle-treated APP_{swe} cells using t test.

Supplementary Figure 4 a SDS-PAGE (low and high exposures) of APP, C99, and C83 detected using APP-Cter antibody in SH-SY5Y cells stably expressing pcDNA3.1 empty vector (control) and APP_{swe} construct (APP_{swe}) in total cell extracts (Tot) and mitochondrial-enriched fraction (Mit). **b** SDS-PAGE and the quantification (means \pm SEM, n=4) of APP, C99, and C83 detected as in (a) in SH-SY5Y cells expressing pcDNA3.1 (control) treated with vehicle (-) or with γ -secretase inhibitor (+) (γ -sec inh) (5 μ M, 20h). **c** Immunostaining of SH-SY5Y control cells treated as in (b) with APP-Cter (green) in combination with anti-HSP60 (red). Nuclei were labeled with DAPI. Images show merge signals reflecting the colocalization in yellow. Scale bars represent 10 μ m. **d** Electron microscopy ultrastructure of SH-SY5Y control cells treated as in (b). Scale bars correspond to 2 μ m.

N: nucleus. Colored arrowheads indicate mitochondria classes as shown in Fig. 1b. **e-h** Quantitative graphs of mitochondria classes (e) and the means \pm SEM of mitochondria area (μm^2) (f), perimeter (μm) (g), and number/ $10\mu\text{m}^2$ (h). (d-h) Data were obtained in two independent experiments in duplicates. The quantification was done in at least 20 different fields (> 150 mitochondria). **b, f-h** * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test.

Supplementary Figure 5 a Protein levels of complexes II-SDHB, III-UQCRC2, IV-COXII, and V-ATP5A in APP_{swe} treated with vehicle (-) or with γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (+) ($5\mu\text{M}$, 20h) (see representative SDS-PAGE in Figure 3). Means \pm SEM, $n=4$ versus control (taken as 100%). **b-f** Spectrophotometric analysis of the respiratory chain complexes II, III, IV, and V activities in APP_{swe} treated as in (a) expressed as absolute values nanomols of substrate/min/mg of proteins and presented as means \pm SEM, $n=3$. Citrate synthase activity was analyzed to ascertain similar mitochondria content between samples. **g, h** Representative plots of FACS analyses of mitochondrial potential (TMRM intensity plotted against cells counts) (g) and ROS (MitoSox intensity plotted against FSCH (forward light scatter)) (h) in SH-SY5Y cells stably transfected with pcDNA3.1 empty vector (control) or APP_{swe} cDNA (APP_{swe}) treated as in (a). P1 and P2 gates represent low and high TMRM intensity respectively (g). **i** Caspase 3-like activity in APP_{swe} expressing cells under basal and STS stimulation ($1\mu\text{M}$, 2h) upon treatment with vehicle, DFK ($10\mu\text{M}$, 20h) or DAPT ($5\mu\text{M}$, 20h). The graph represents fluorescence intensity (Fluorescence units (FU)/mg protein/h) \pm SEM, $n=4$. **a-f** ns: non-significant versus control using Mann Whitney test. **i** **** $P < 0.0001$ using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test.

Supplementary Figure 6 a-d TMRM (a, b) and MitoSox (c, d) median intensities obtained by FACS analyses in SH-SY5Y cells stably transfected with pcDNA3.1 empty vector (control) (a, c) or in MEF WT and MEF APPKO (b, d) treated with vehicle (-) or γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (+) ($5\mu\text{M}$, 20h). Data are presented as means % \pm SEM, $n=3-5$ of controls (taken as 100%). **e** Caspase 3-like activity was assessed under basal and STS stimulation ($1\mu\text{M}$, 2h) in the same experimental conditions

described as in (b, and d). Fluorescence intensities expressed in Fluorescence units (FU)/mg protein/h and are the means \pm SEM, n=4. **a-d** * $P < 0.05$, ns: non-significant versus control using Mann Whitney test. **e** **** $P < 0.0001$, and ns: non-significant using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test.

Supplementary Figure 7 a Expression levels of complexes II-SDHB, III-UQCRC2, IV-COXII, and V-ATP5A in HEK cells transiently transfected with pcDNA3.1 empty (control) or C99 construct (see representative SDS-PAGE in Figure 4). Means \pm SEM, n=5 are presented versus control (taken as 100%). **b-f** Spectrophotometric analysis of the respiratory chain complex II, III, IV, and V activities expressed as absolute values in nanomols of substrate/min/mg of proteins and presented as means \pm SEM, n=4. Citrate synthase activity was analyzed to ascertain similar mitochondria content between samples. **a-f** ns: non-significant versus control using Mann Whitney test.

Supplementary Figure 8 a Cells undergoing mitophagy (cells with fragmented red mitochondria revealed with Cox8-EGFP-mCherry probe) in APPswe cells treated with vehicle, oligomycin A (OA) (10 μ M, 20h), or with OA and antimycin A (AA) (1 μ M, 20h) presented as means \pm SEM, n>100 cells. **b** Immunostaining of APPswe cells treated with vehicle or with γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (5 μ M, 20h) and stained with p62, Parkin or phospho-poly-ubiquitin (p-S65-Ub: p-Ub) antibodies (green) and anti-HSP60 (red). **c** Representative images of APPswe cells transfected with LAMP1-GFP probe (green) and Mit-RFP probe (red) and treated as in (b). The graph shows the colocalization (Mander's coefficient) of Mit-RFP with LAMP1-GFP, means \pm SEM of n=14 cells. **d** Immunostaining of SH-SY5Y cells stably expressing control and C99 constructs and treated with vehicle or with γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (5 μ M, 20h) and stained with anti-Parkin (green) and anti-HSP60 (red). **b-d** Images show merge of green and red signals reflecting the colocalization in yellow. Scale bars represent 10 μ m. Where indicated, nuclei were labeled with DAPI. **a** ** $P < 0.01$, and ns: non-significant using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparison post-test. **c** ns: non-significant versus vehicle using Mann Whitney test.

Supplementary Figure 9 a SDS-PAGE of LC3-I and LC3-II, SQSTM1/p62 (p62), Parkin, TIMM23, and HSP10 in mitochondria-enriched fraction of SH-SY5Y control cells treated with vehicle (-) or γ -secretase inhibitor (γ -sec inh) (+) (5 μ M, 20h). Tubulin was used as loading control. **b-c** Expression levels of indicated proteins as means \pm SEM, n=3-5 versus control (taken as 100%). **d** Immunostaining of SH-SY5Y control treated as in (a) and stained with p62, Parkin or phospho-poly-ubiquitin (p-S65-Ub: p-Ub) antibodies (green) and anti-HSP60 (red). **e** Representative images SH-SY5Y cells transfected with LAMP1-GFP probe (green) and Mit-RFP probe (red) and treated as in (a). The graph shows the colocalization (Mander's coefficient) of Mit-RFP with LAMP1-GFP, means \pm SEM of n=14 cells. **d, e** Images show merge of green and red signals reflecting the colocalization in yellow. Scale bars represent 10 μ m. Nuclei were labeled with DAPI. **b, c** * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, and ns: non-significant using Mann Whitney test.

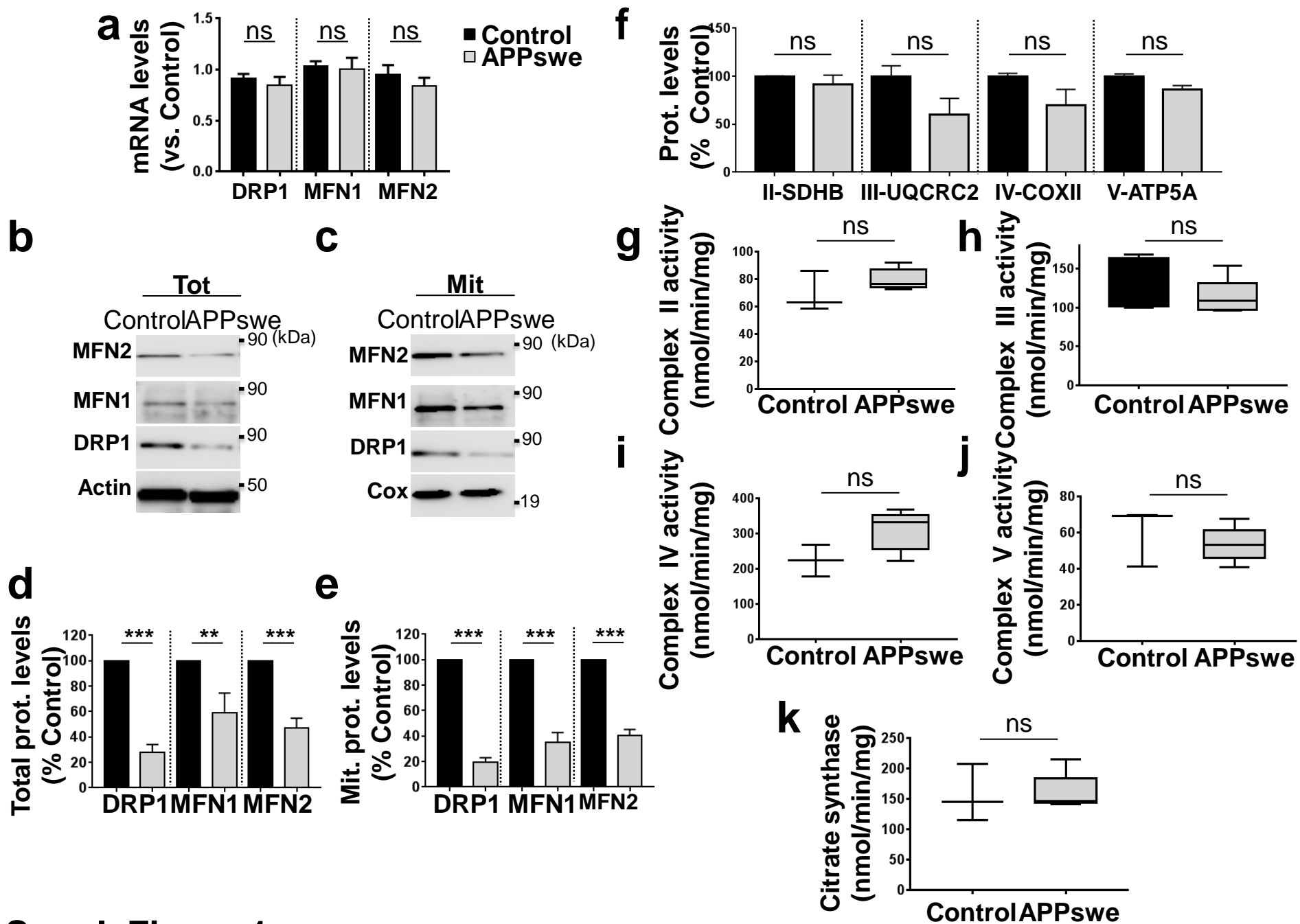
Supplementary Figure 10 a Brain section of 12 months old AAV-C99 injected mice stained with APP-Cter antibody (shown also in Figure 8a). Boxed area represents subiculum region analyzed by electron microscopy. Scale bar represent 500 μ m. **b** Electron microphotographs of neuronal soma of young (2-3 months old) AAV-C99-injected mice. N: nucleus. Yellow and red arrows indicate mitochondria classes I or II shown in representative images in (c). **c-e** Quantitative graphs of mitochondria classes (c) and of the means \pm SEM of mitochondria area (μm^2) (d), and perimeter (μm) (e). (b-e) Data were obtained in two mice for each condition (> 20 analyzed field, >100 of measured mitochondria area and perimeter). **c** * $P < 0.05$ using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparison post-test. **d, e** ns: non-significant versus respective AAV-free using Mann Whitney test.

Supplementary Figure 11 a-d Correlation plots between A β and LC3-II/I (a), p62 (b), Parkin (c), and PINK1 (d) levels in controls (n=6-7, white dots), and AD (n=9-10, red dots) brains. **e** SDS-PAGE and quantification of pTau detected with AT8 antibody. Graph represents mean \pm SEM versus control taken as 100% of control (n=8) and AD brains (n=13) (patients information in suppl. Table 1). **f-i**

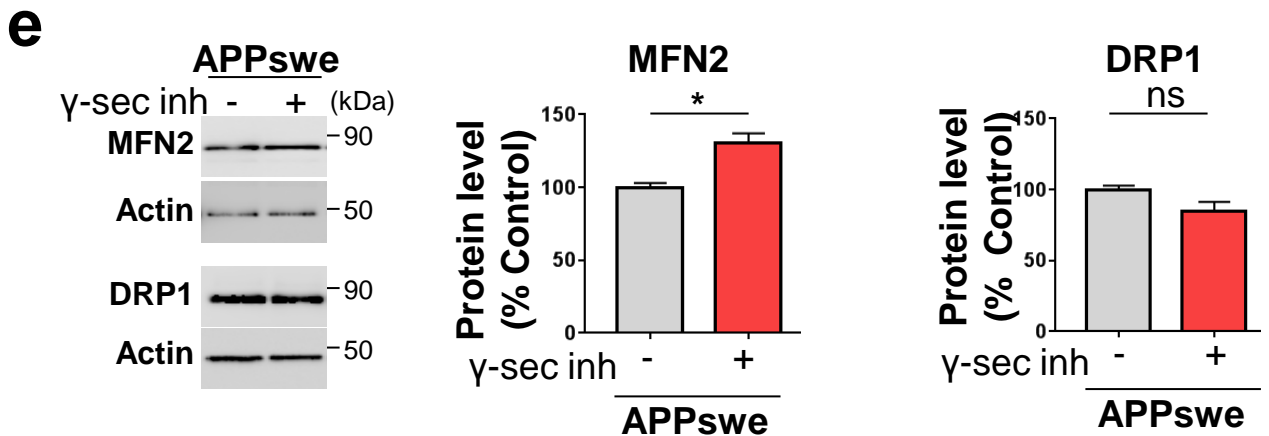
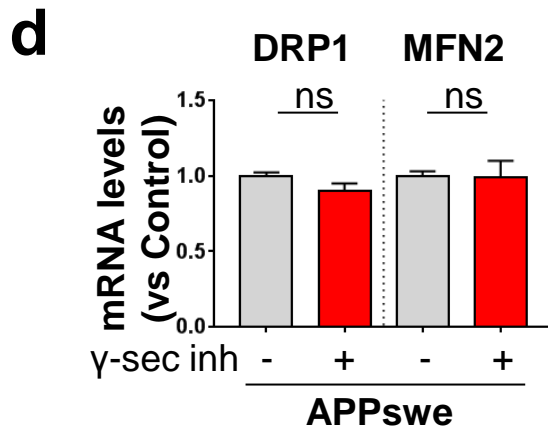
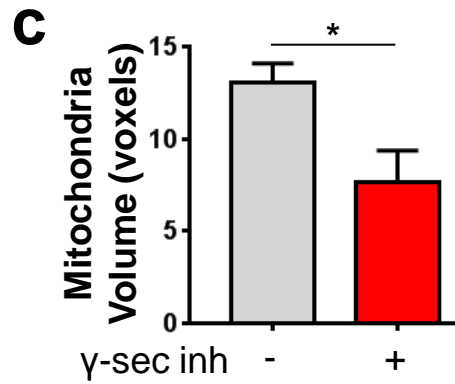
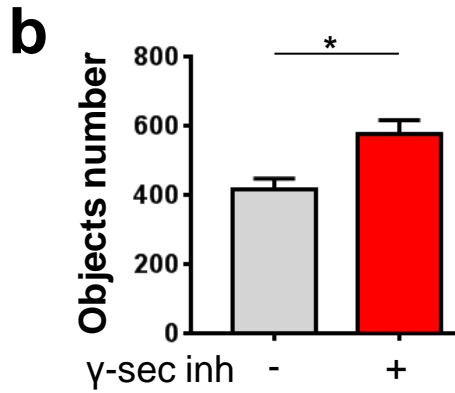
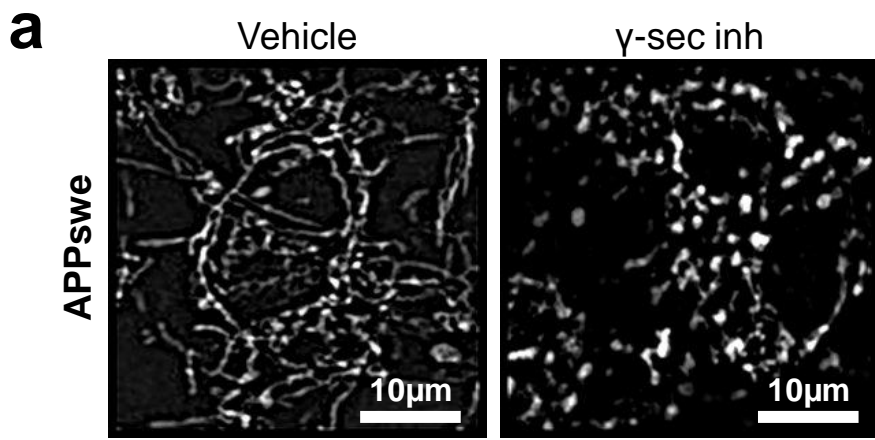
Correlation plots between pTau and LC3-II/I (f), p62 (g), Parkin (h), and PINK1 (i) levels in controls (n=6-7, white dots), and AD (9-10, red dots) brains. **a-d, f-i** Linear regression was used to determine *P* and goodness of fit (R^2) values.

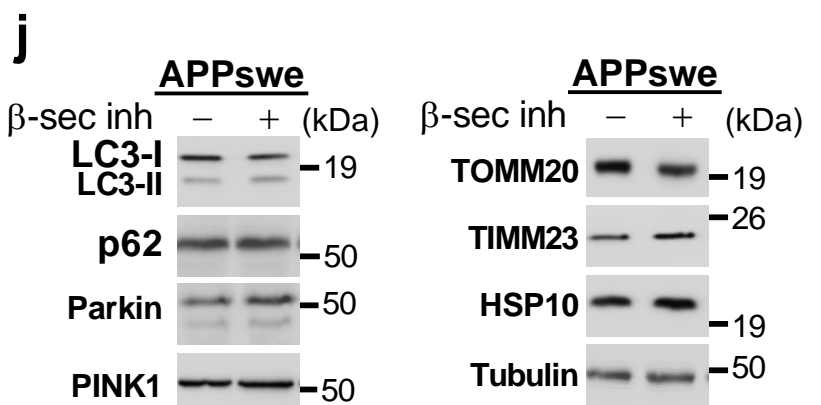
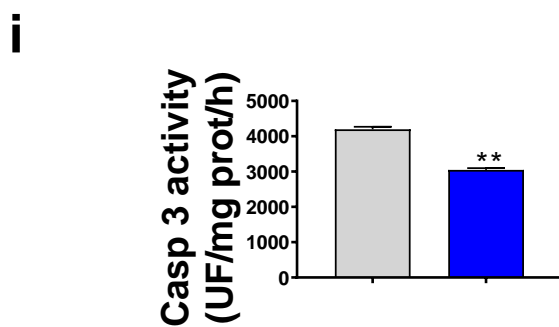
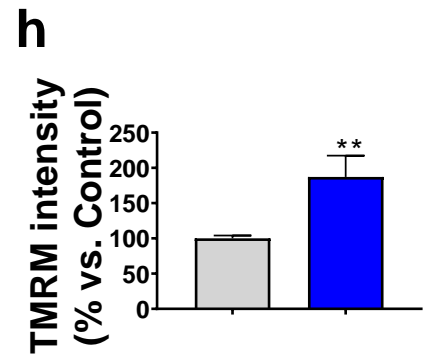
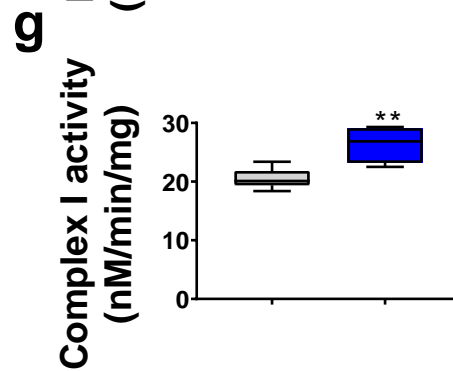
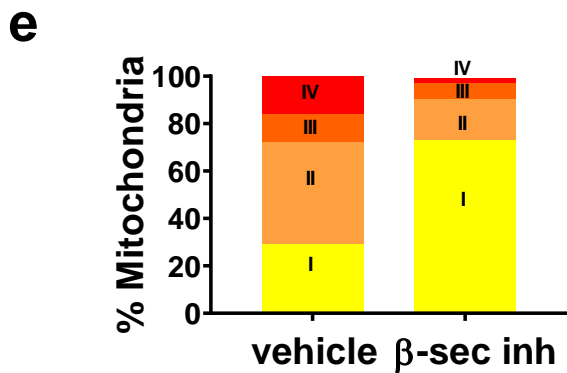
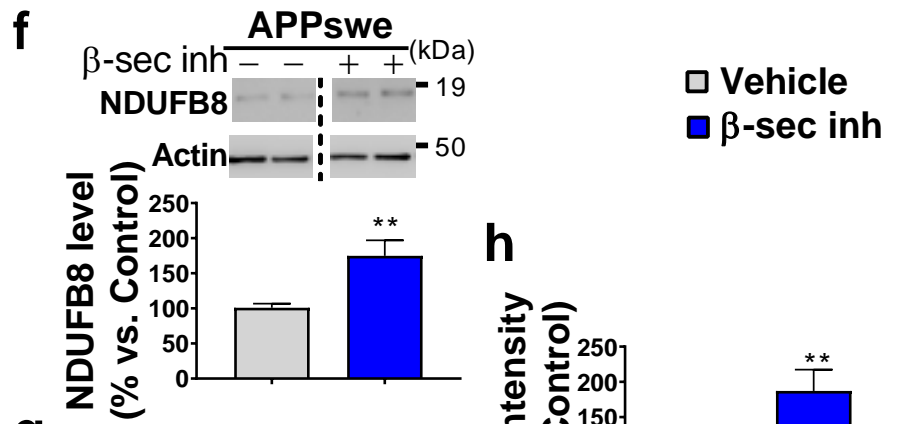
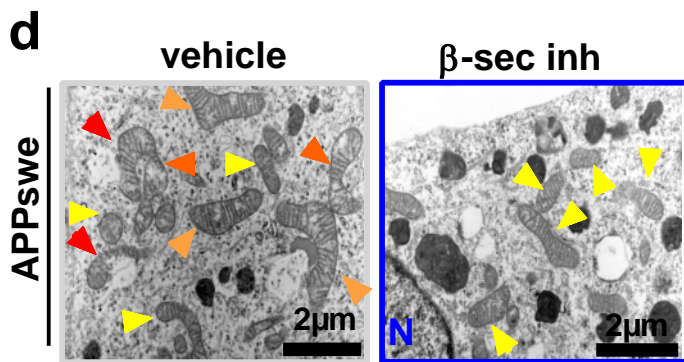
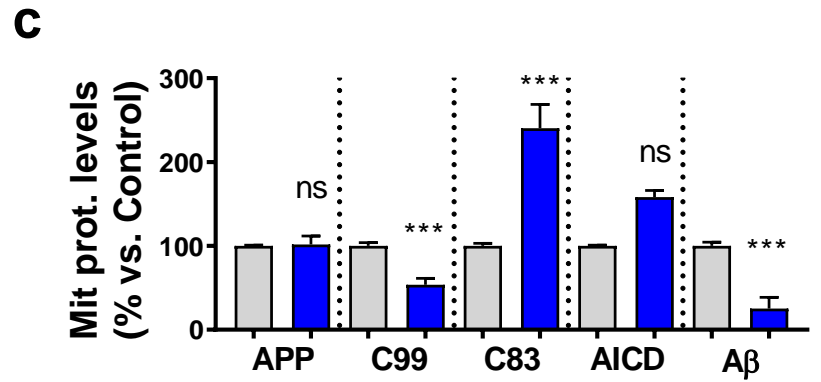
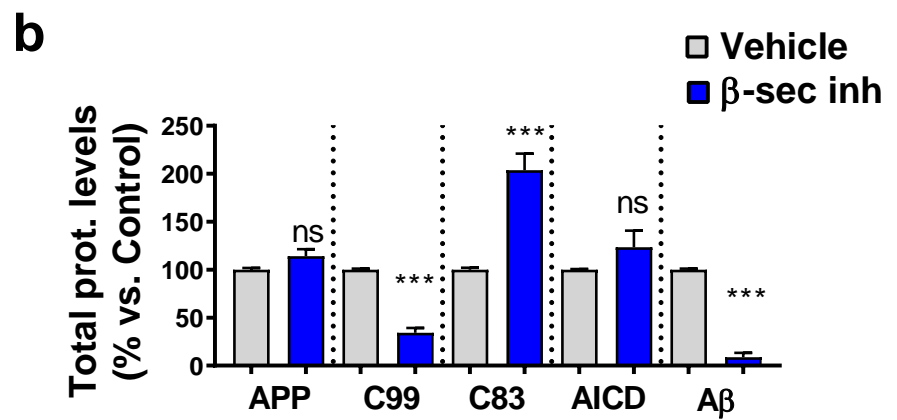
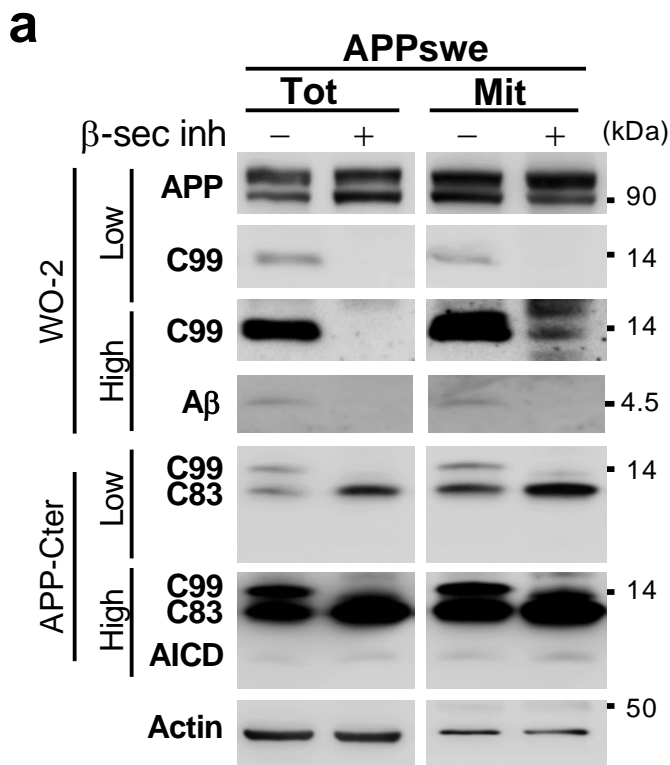
References

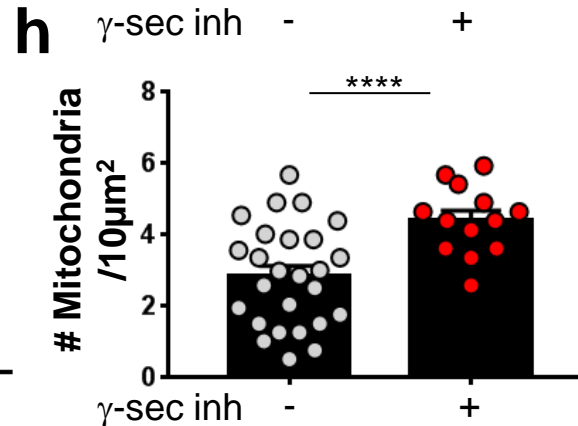
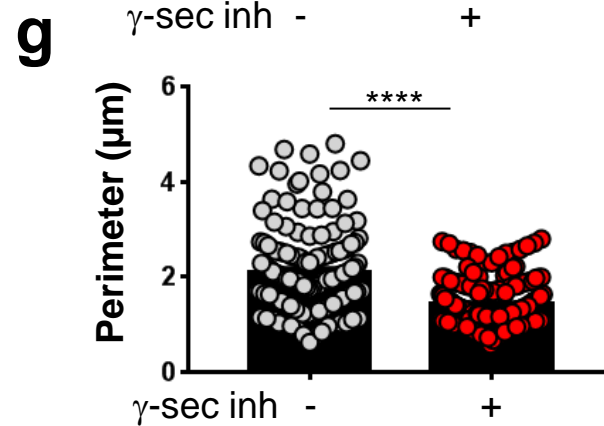
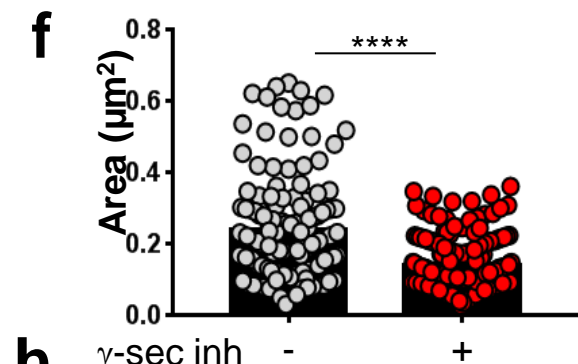
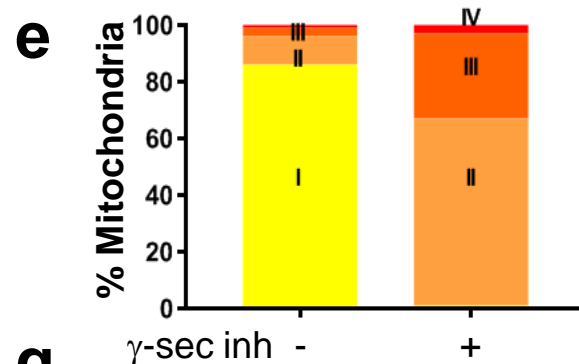
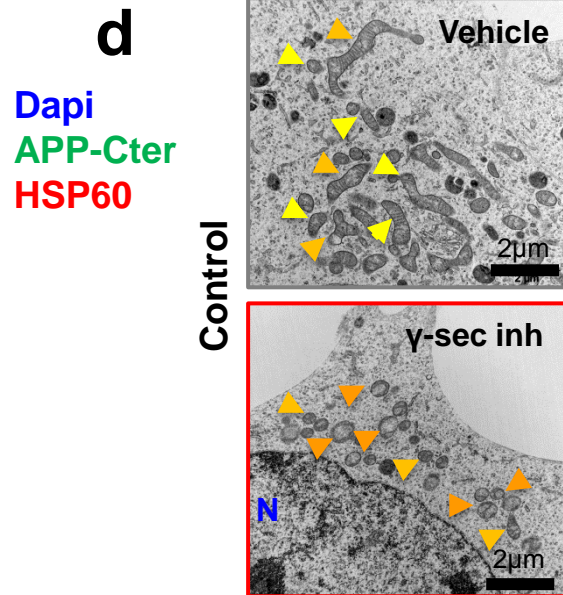
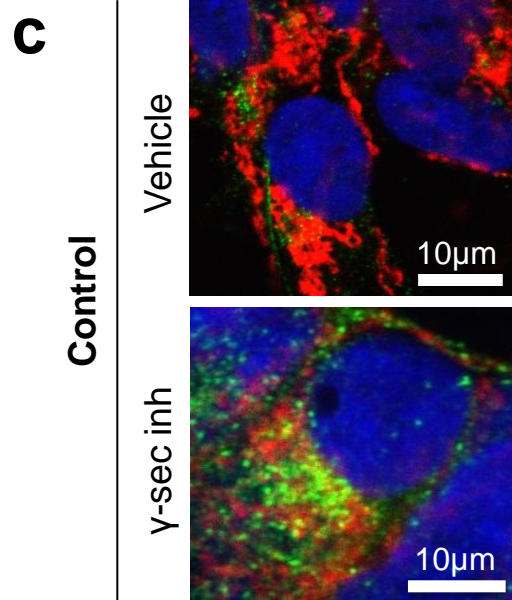
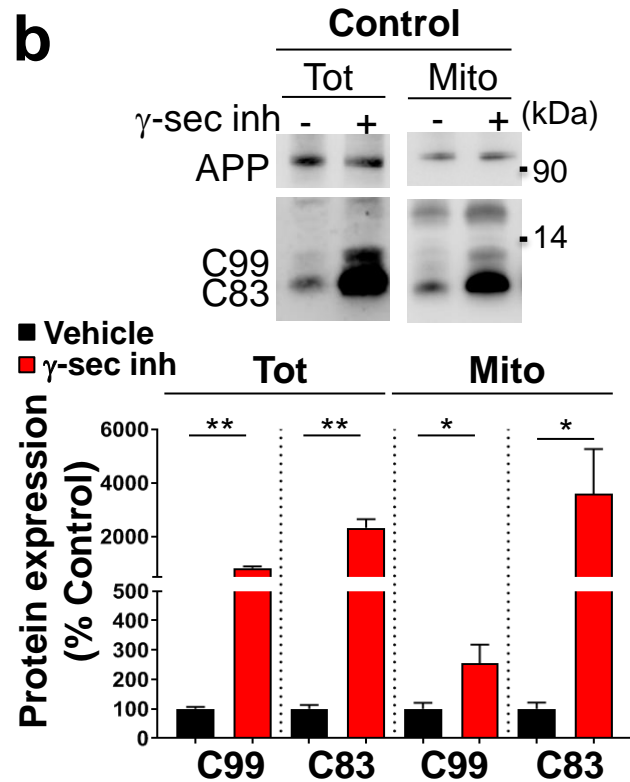
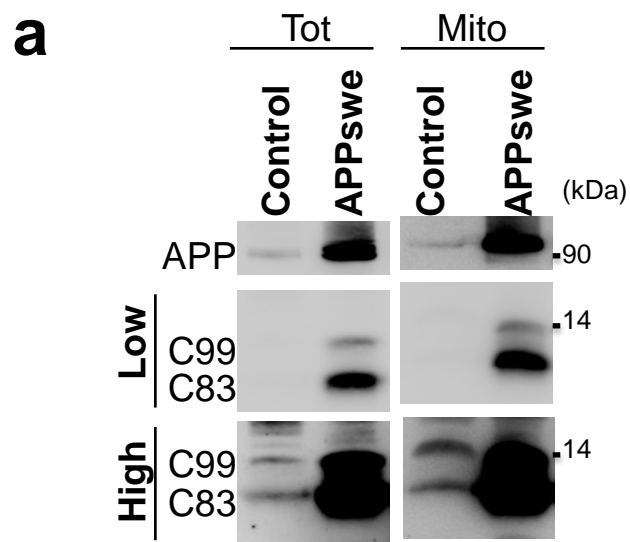
1. Cordelieres FP, Bolte S (2014) Experimenters' guide to colocalization studies: finding a way through indicators and quantifiers, in practice. *Methods Cell Biol* 123:395-408. doi:10.1016/B978-0-12-420138-5.00021-5
2. Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Muller U (2000) Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* 20:7951-7963



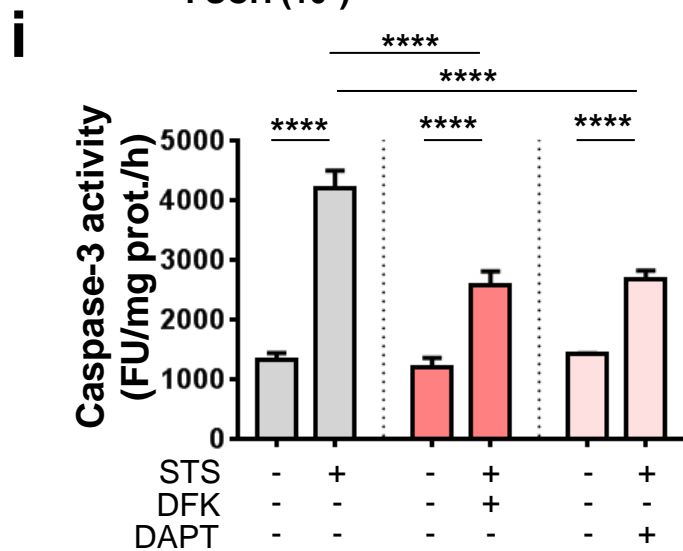
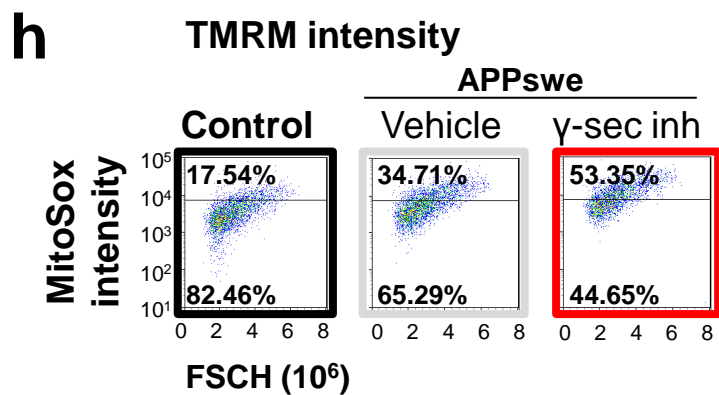
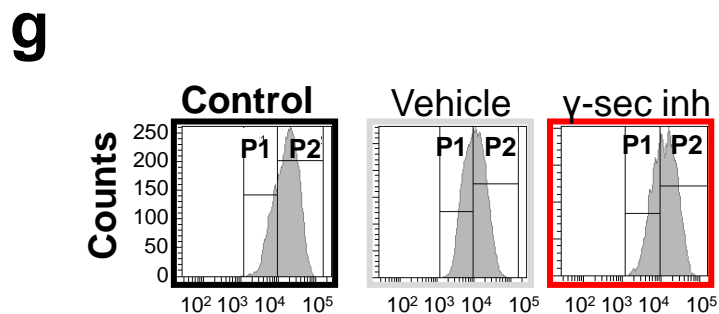
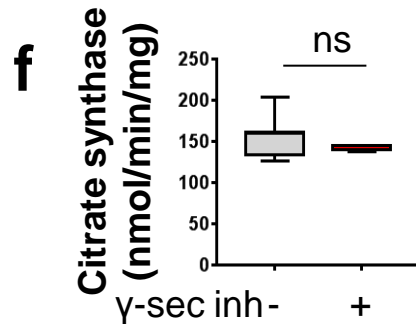
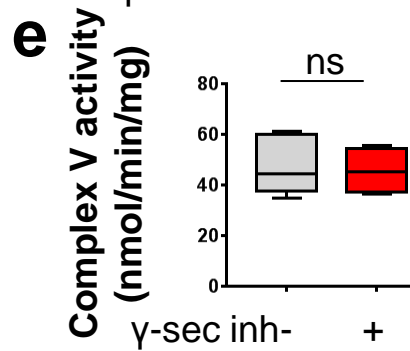
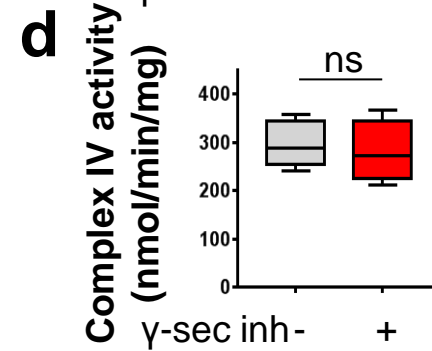
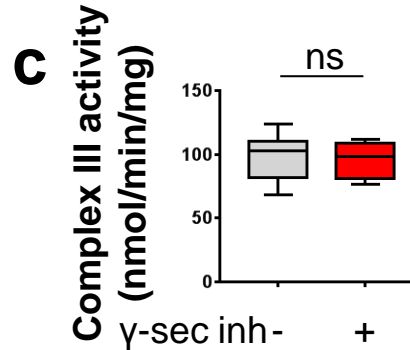
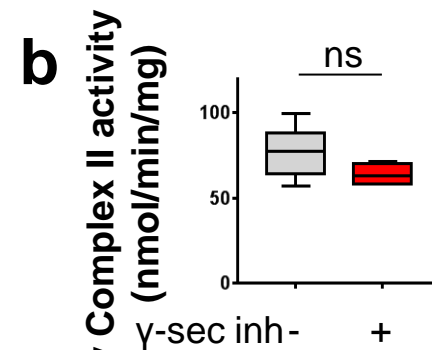
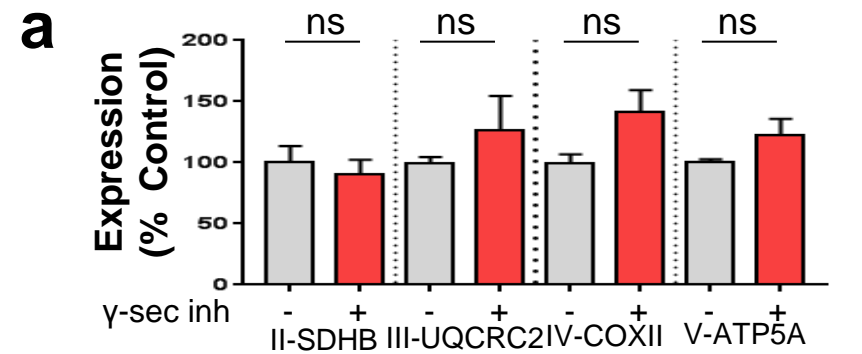
Suppl. Figure 1



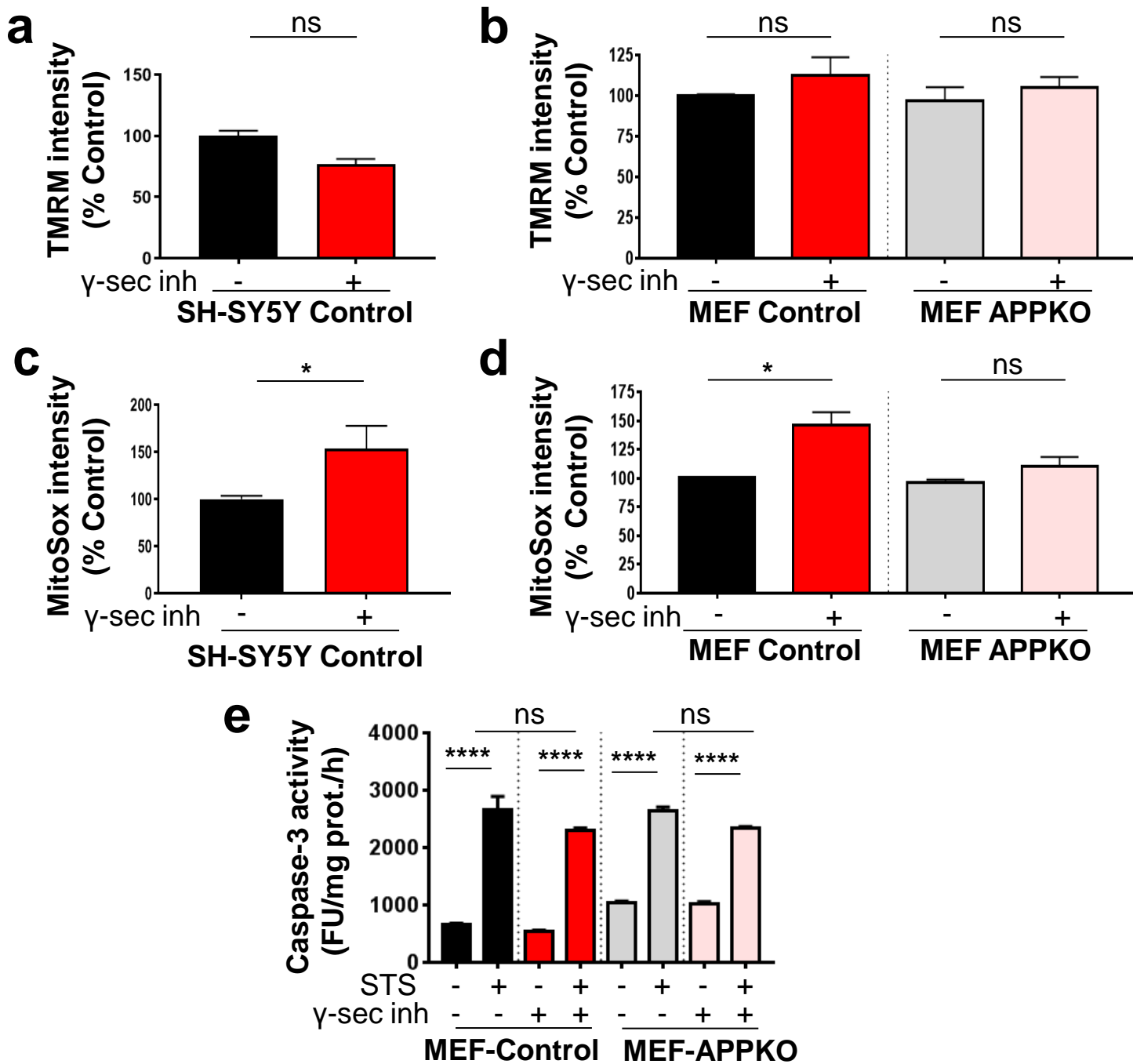




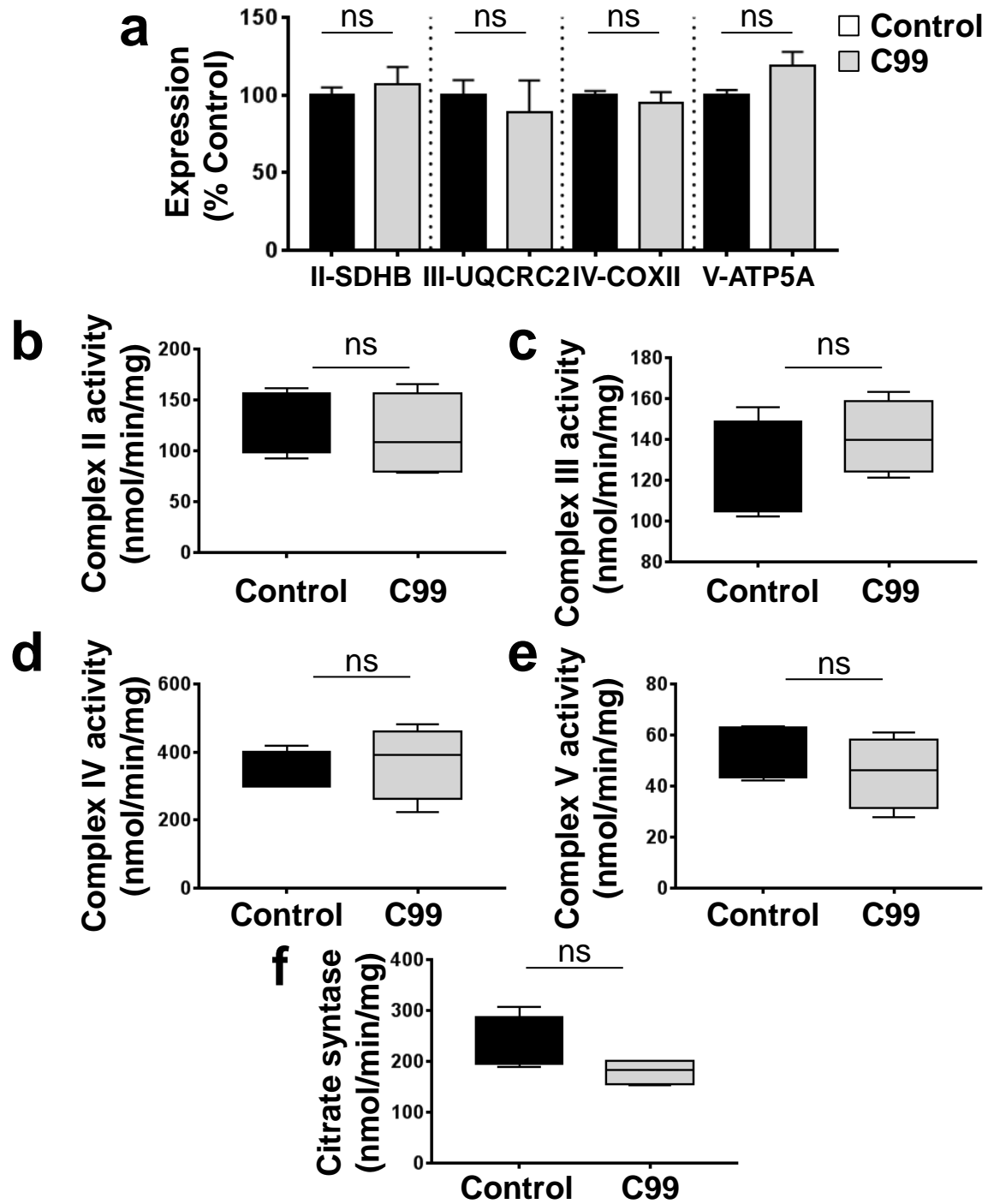
Suppl. Figure 4

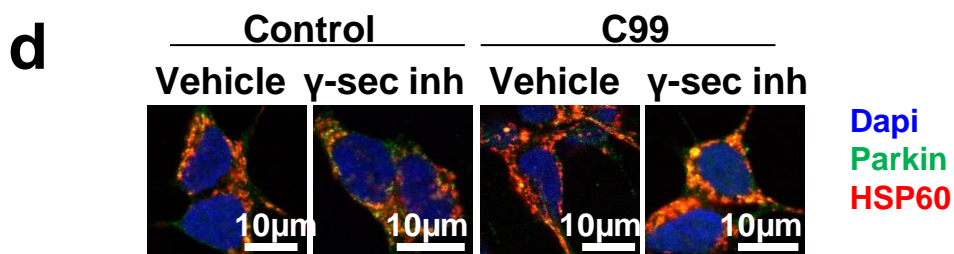
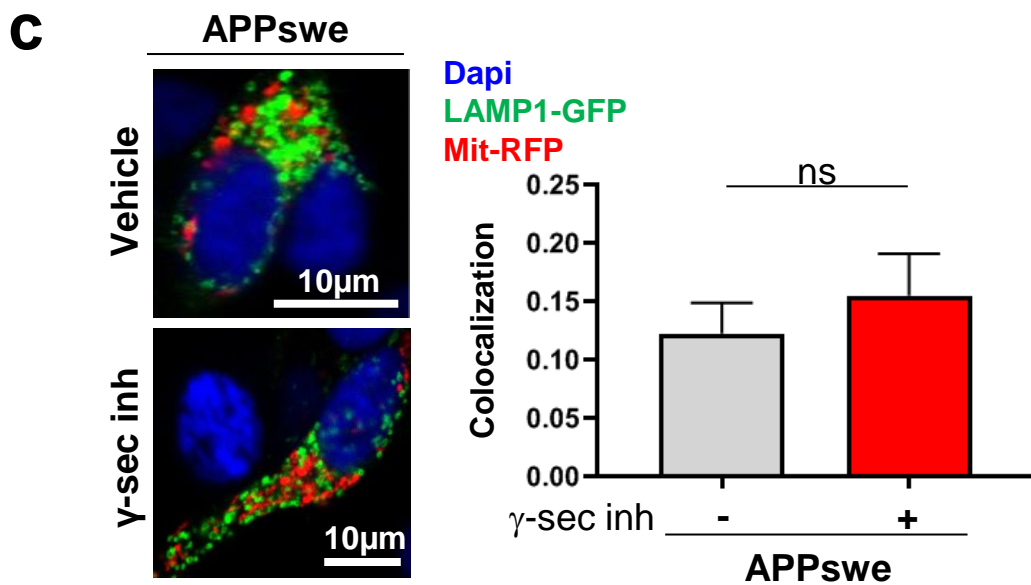
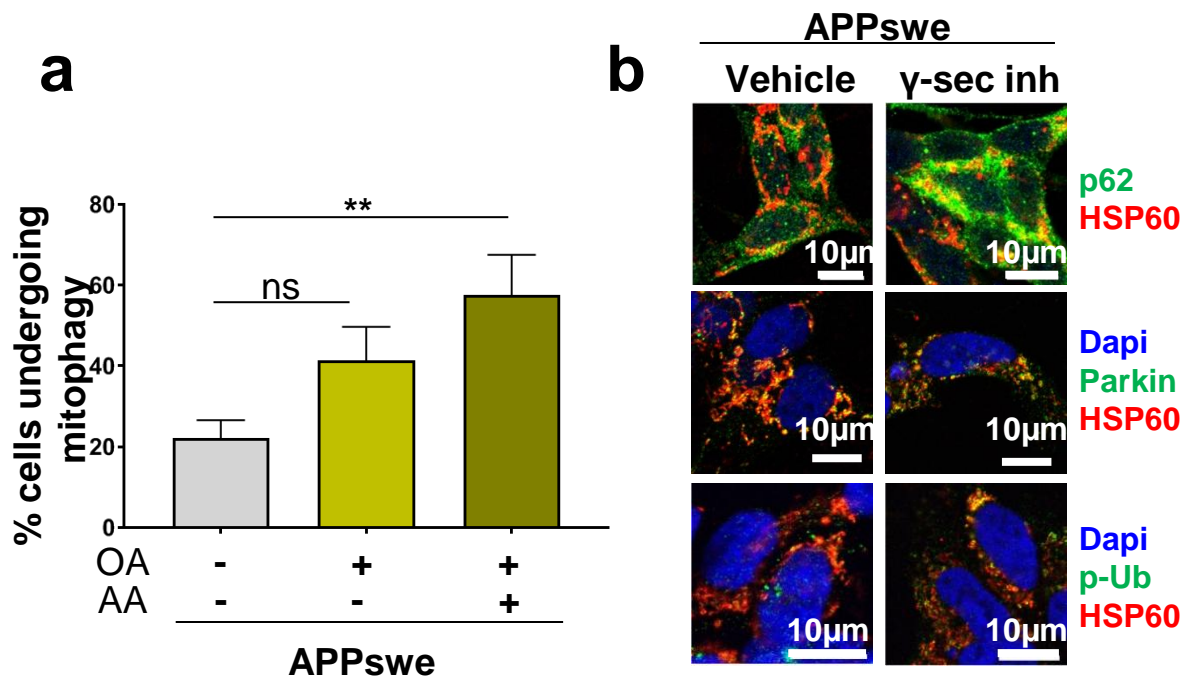


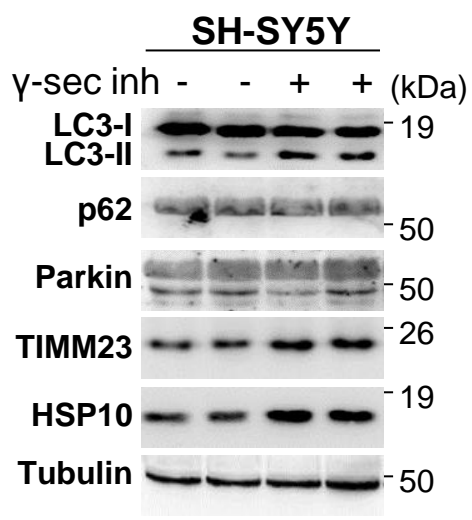
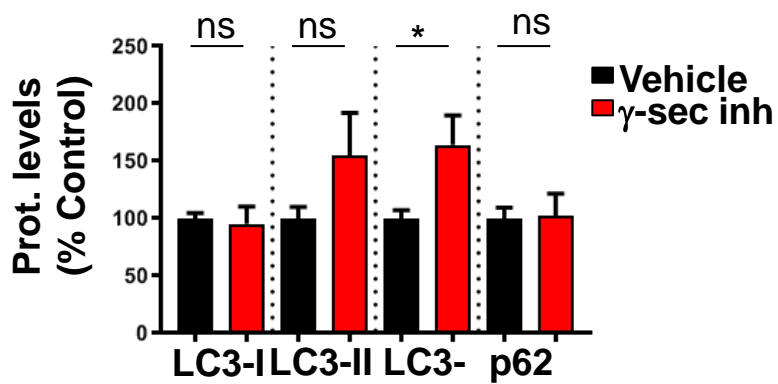
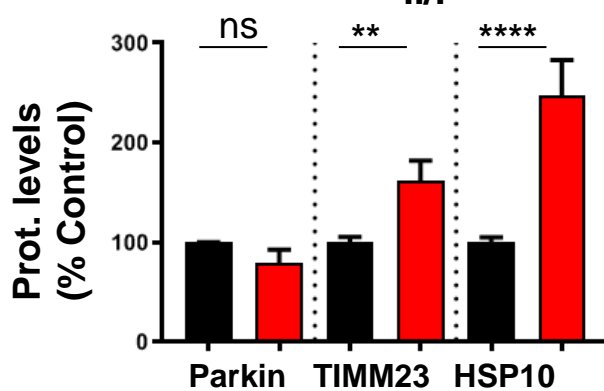
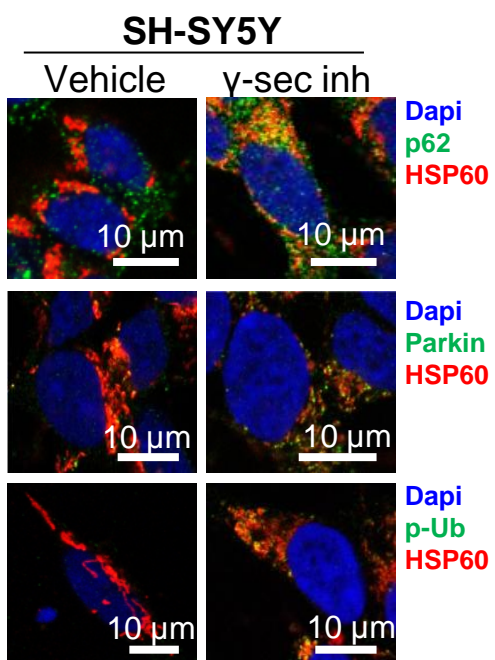
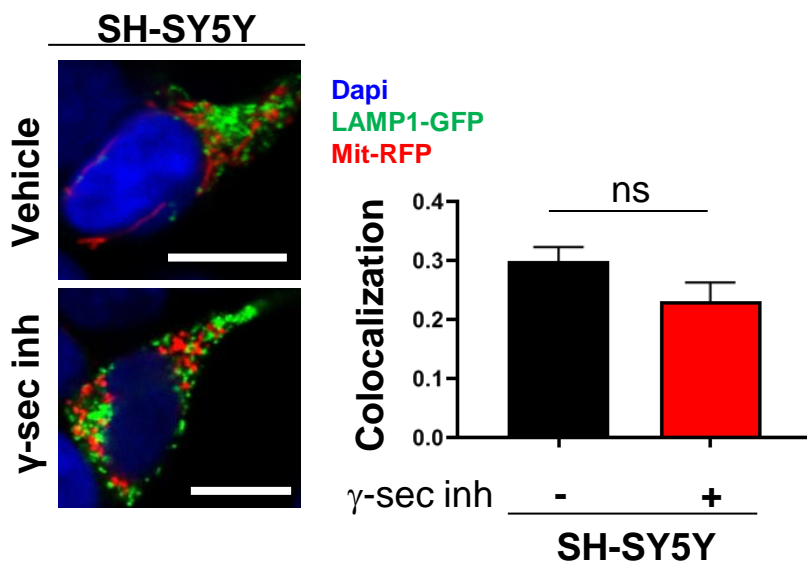
Suppl. Figure 5

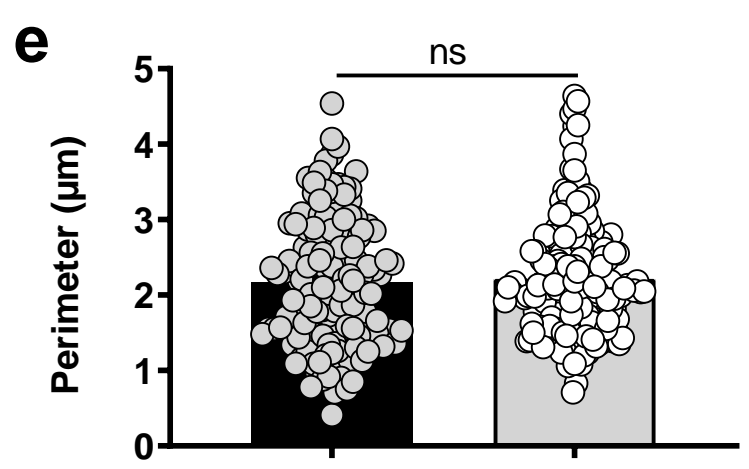
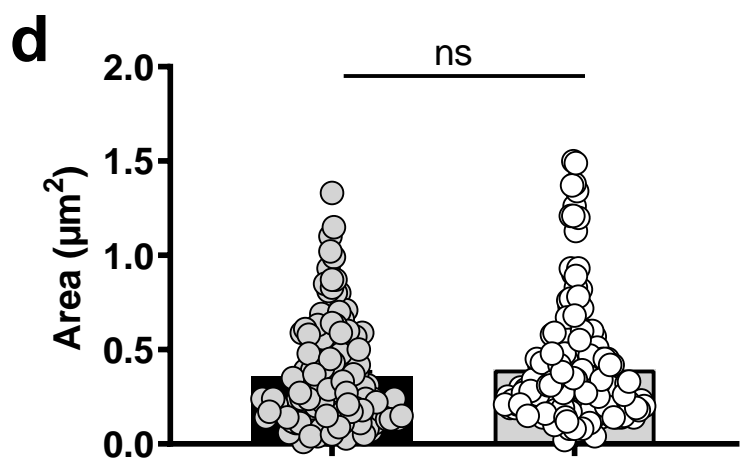
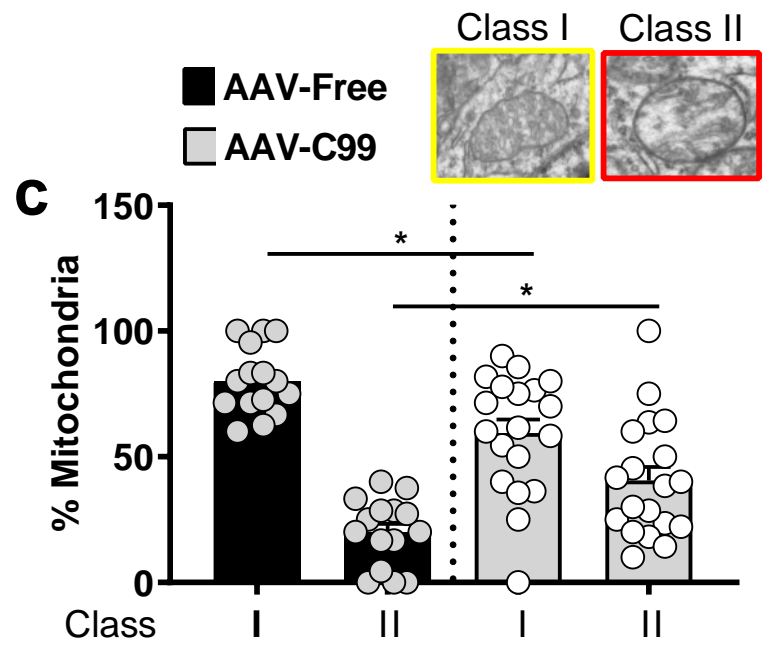
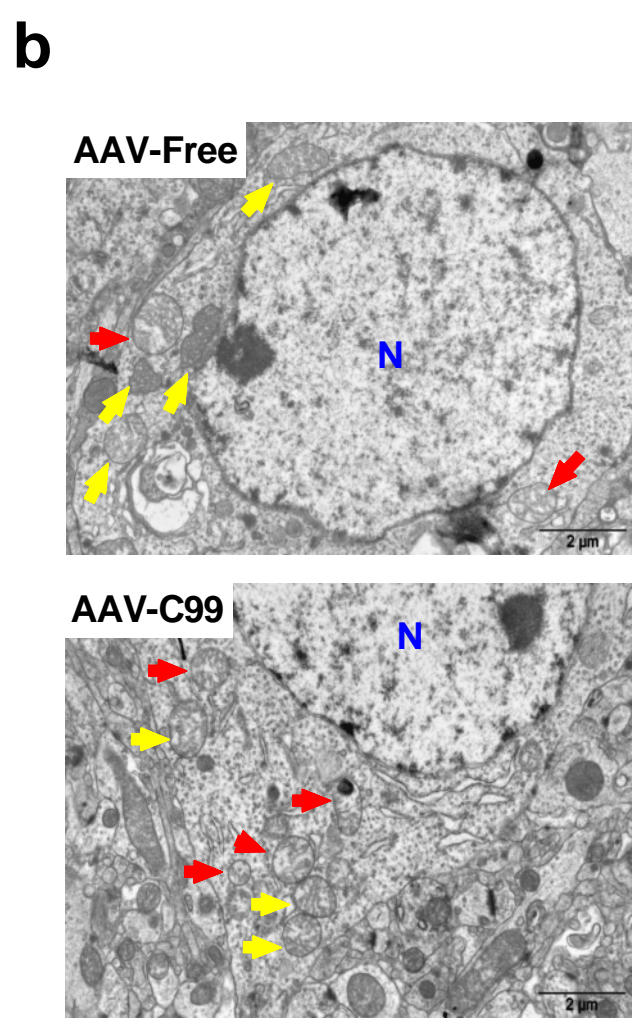
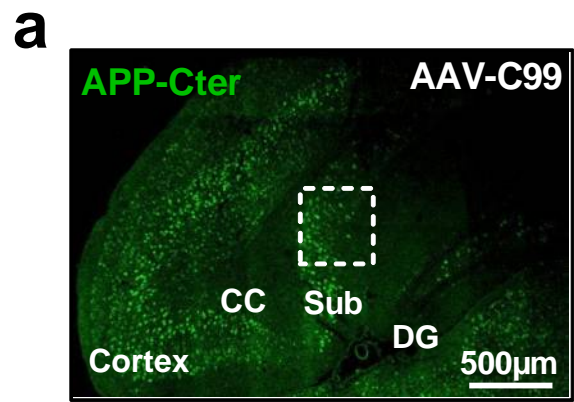


Suppl. Figure 6

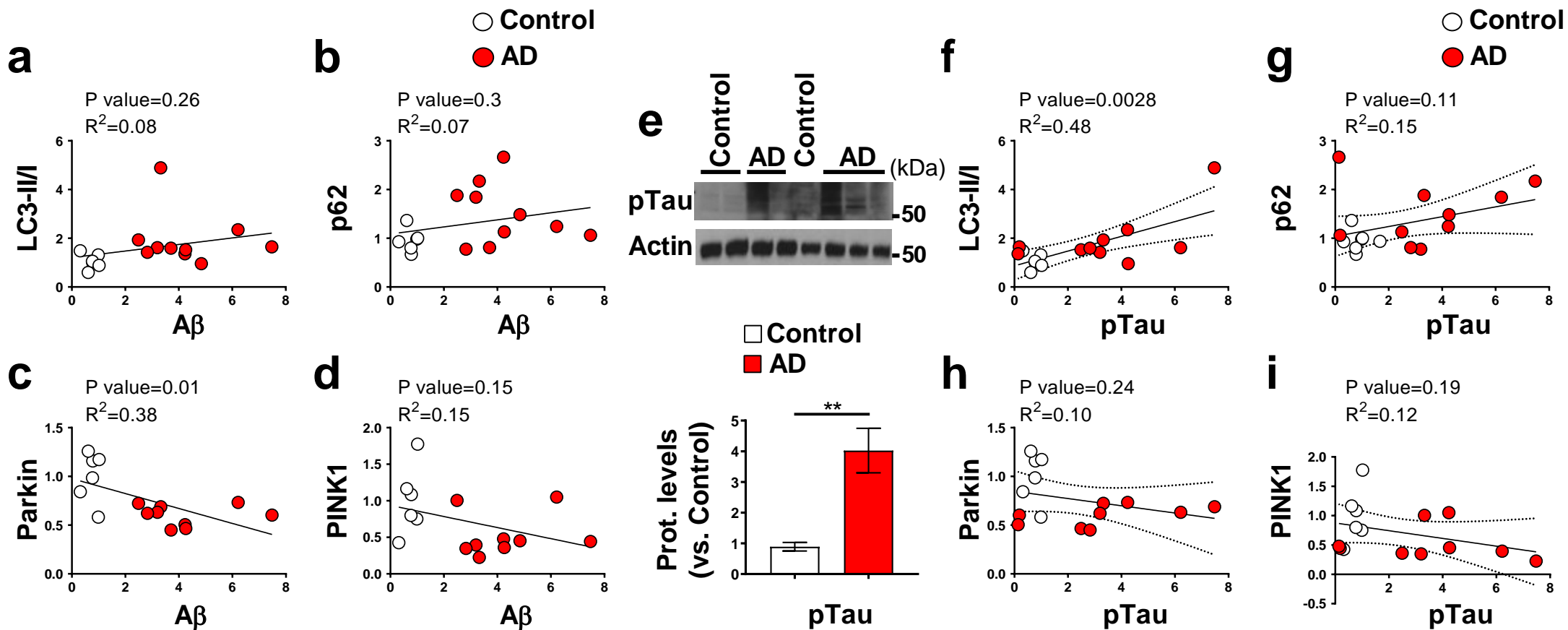




a**b****c****d****e**



Suppl. Figure 10



Suppl. Figure 11

Table 1: Demographic data and neuropathological findings related to human brain samples used in SDS-PAGE analyses (temporal lobe), and brain-derived slices used in immunohistochemistry analyses (T1 region of the temporal lobe)

	Age (years)	Gender	PMD (h)	Braak's NFT stage [#]
Brain samples used in SDS-PAGE analyses				
Control	71	Male	26	-
Control	84	Male	32	-
Control	71	Female	15	-
Control	55	Male	25	-
Control	78	Male	35	-
Control	61	Male	20	-
ALS	62	Female	44	-
ALS	55	Male	21	-
ALS	62	Female	21	-
AD	68	Female	51	I-II
AD	68	Female	10	I-II
AD	80	Female	51	V
AD	84	Female	81	V
AD	65	Female	41	VI
AD	81	Male	19	VI
AD	89	Female	26	VI
AD	93	Female	21	VI
AD	91	Female	34	VI
AD	55	Female	58	VI
AD	79	Male	31	VI
AD	86	Male	32	VI
AD	75	Female	7	VI
AD	81	Female	NA	VI
AD	82	Female	NA	VI
Brain-derived slices used in immunohistochemistry analyses				
AD	81	Female	NA	VI
AD	55	Female	NA	IV
AD	79	Male	NA	VI
AD	84	Female	NA	V
AD	65	Female	NA	V
AD	80	Female	NA	V

PMD: Post mortem delay, h: hours, NA: not available. Controls are brain samples isolated from post-mortem patients diagnosed as negative for several neuropathologies. ALS are control brains samples diagnosed as negative for AD pathology obtained from pos-mortem patients diagnosed with Amyotrophic lateral sclerosis. [#] Braak and Braak's NFT (neurofibrillary tangle: tau-related pathology) stage, (-) means no NFT detection

Supplementary Table 2: List of antibodies used in the study

Antibody	Host	Supplier	WB dilution	IF dilution
6E10 (1-16 aa of A β) (SIG-39320)	Mouse	Covance/SIGMA	1/1000	1/2000
WO-2 (4-10 aa of A β) (MABN10)	Mouse	SIGMA	1/1000	-
APP Cter (A8717)	Rabbit	Gift from P. Fraser (Toronto)	1/1000	1/5000
82E1 (1 st free aa of A β and C99) (10323)	Mouse	IBL America	1/1000	1/1000
pTau (Ser202, Thr205) (AT8)	Mouse	ThermoFisher	1/1000	-
HSP60 (H-1; sc-13115)	Mouse	Santa Cruz Biotechnologies	1/1000	1/200
HSP60 (N-20; sc-1052)	Goat	Santa Cruz Biotechnologies	1/2000	1/200
HSP10/Cpn10 (ADI-SPA-110)	Rabbit	StressGen	1/1000	-
p62/SQSTM1 (NBP1-49956)	Rabbit	Novus Biologicals	1/1000	1/2000
Parkin (MAB5512)	Mouse	Millipore	1/1000	1/500
TIMM23 (611222)	Mouse	BD Transduction Laboratories	1/5000	1/200
TOMM20 (612278)	Mouse	BD Transduction Laboratories	1/5000	-
P-Ub pS65 (A110)	Rabbit	Boston Biochem	1/1000	1/200
Pink1 (C2; AC-R3173-2)	Rabbit	Abiocode	1/1000	-
Cleaved Caspase 3 (Asp175)	Rabbit	Cell Signaling Technology	1/1000	-
Human OXPHOS (110411)	Mouse	Abcam	1/1000	-
LC3/ MAP1LC3B (NB100-2220)	Rabbit	Novus Biologicals	1/1000	-
Mitofusin 1 (ARP57702)	Rabbit	Aviva System Biology	1/1000	-
Mitofusin 2 (ab56889-100)	Mouse	Abcam	1/1000	-
Drp1/DLP1 (611112)	Mouse	BD Transduction Laboratories	1/1000	-
Cox VI (3E11)	Rabbit	Cell signaling	1/5000	-
Tubulin	Mouse	Sigma Aldrich	1/2000	-
β -Actin (AC-74)	Mouse	Sigma Aldrich	1/5000	-

Supplementary Tables 3: Mitochondria size and morphology in mice (a) and cellular models models (b). Statistical values are depicted in corresponding graphs.

(a) Mice models	Brain region	Area (μm^2)	Perimeter (μm)	Mitochondria Classe I (%)	Mitochondria Class II (%)		
WT (5mo)	Subiculum	0.35 ± 0.013	2.24 ± 0.044	91 ± 2	9 ± 2		
WT (17mo)	Subiculum	0.23 ± 0.009	1.8 ± 0.042	50 ± 6	50 ± 6		
WT (5mo) + γ -sec inh	Subiculum	0.38 ± 0.013	2.22 ± 0.062	52 ± 8	48 ± 8		
3xTgAD (5mo)	Subiculum	0.27 ± 0.015	1.9 ± 0.062	79 ± 3	21 ± 3		
3xTgAD (17 mo)	Subiculum	0.33 ± 0.012	2.12 ± 0.051	18 ± 4	82 ± 4		
2xTgAD (17 mo)	Subiculum	0.317 ± 0.014	2.1 ± 0.054	19 ± 4	81 ± 4		
3xTgAD (5mo) + γ -sec inh	Subiculum	0.45 ± 0.03	2.4 ± 0.085	19 ± 5	81 ± 5		
AAV-Free (2-3 mo)	Cortex	0.21 ± 0.017	1.72 ± 0.095	91 ± 3	9 ± 3		
AAV-Free (12 mo)	Cortex	0.16 ± 0.011	1.5 ± 0.065	96 ± 2	4 ± 2		
AAV-C99 (2-3 mo)	Cortex	0.22 ± 0.014	1.76 ± 0.07	47 ± 5	53 ± 5		
AAV-C99 (12 mo)	Cortex	0.25 ± 0.011	2 ± 0.058	52 ± 6	48 ± 6		
AAV-Free (2-3 mo)	Subiculum	0.35 ± 0.021	2.16 ± 0.07	80 ± 3.4	20 ± 3.5		
AAV-C99 (2-3 mo)	Subiculum	0.34 ± 0.014	2.21 ± 0.053	60 ± 5.4	40 ± 5.4		
(b) Cellular models	Area (μm^2)	Perimeter (μm)	Number/10 μm^2	Mitochondria Classe I (%)	Mitochondria Class II (%)	Mitochondria Classe III (%)	Mitochondria Classe IV (%)
Control	0.41 ± 0.018	2.19 ± 0.07	2.8 ± 0.27	86 ± 3	10 ± 2	3 ± 2	1 ± 1
APPswe	0.8 ± 0.043	3.22 ± 0.10	1.8 ± 0.18	29 ± 5	43 ± 5	12 ± 3	16 ± 4
Control + γ -sec inh	0.26 ± 0.009	1.5 ± 0.028	4.39 ± 0.26	1 ± 1	66 ± 6	30 ± 6	3 ± 1
APPswe + γ -sec inh	0.47 ± 0.017	2.05 ± 0.045	3.5 ± 0.27	1 ± 1	47 ± 6	50 ± 6	2 ± 1
APPswe + β -sec inh	0.59 ± 0.03	3.4 ± 0.1	2.3 ± 0.3	76 ± 6	13 ± 5	7 ± 3	4 ± 2

RESULTATS PARTIE II

Article 2 : « La défaillance de la signalisation AMPK-ULK1 provoque des dysfonctions mitochondriales, mitophagiques, et de la neuroinflammation dans la maladie d'Alzheimer. »

Hampered AMPK-ULK1 cascade instigates mitochondrial dysfunctions, mitophagy and neuroinflammation in Alzheimer's disease.

Arnaud Mary, Paula Fernanda Kinoshita, Fanny Eysert, Audrey Valverde, Sandra Lacas-Gervais, Charlotte Bauer, Sabiha Eddarkaoui, Anne-Sophie Gay, Delphine Debayle, Luc Buée, Valérie Buée-Scherrer, Frédéric Checler, Mounia Chami.

Travail en cours de soumission.

Résumé des résultats

Dans cette étude, nous avons analysé la signalisation AMPK-ULK1 dans les cellules modèles de la MA exprimant l'APP^{swe} ou le fragment C99, les souris 3xTgAD et dans des nécropsies de cerveaux issus de patients Alzheimer sporadiques. Nous avons observé une perturbation de la signalisation AMPK-ULK1 dans ces différents modèles d'études et échantillons de patients.

L'inhibition pharmacologique de l'AMPK avec le compound C (CC) est associée, dans les cellules APP^{swe}, à une exacerbation de l'accumulation des APP-CTFs monomériques et oligomériques, une fragmentation excessive des mitochondries, et à des dysfonctions mitochondriales (hyperpolarisation de la membrane et augmentation de la production de ROSmit). Le traitement au CC provoque aussi un blocage de la mitophagie, caractérisé par une baisse du recrutement de la Parkine à la mitochondrie et de la fusion des mitophagosomes avec les lysosomes. De plus, les fonctions lysosomales semblent également réduites car il y a une baisse du nombre de lysosomes associée à une accumulation des autolysosomes/amphisomes.

A l'inverse, la stimulation pharmacologique de l'AMPK avec la metformine (MET) est associée dans les cellules APP^{swe} à une réduction de l'accumulation des APP-CTFs, une réduction de la surcharge en calcium cytosolique, et à une correction des dysfonctions mitochondriales.

L'expression de formes génétiquement actives ou inactives de l'AMPK dans les APP^{swe} a permis de valider nos résultats obtenus avec l'approche pharmacologique. Ainsi, l'expression d'un mutant dominant négatif de l'AMPK entraîne une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale, une augmentation de la production des ROSmit. A l'inverse, l'expression d'une forme constitutive active de l'AMPK entraîne une réduction de la production des ROSmit.

Chez des souris 3xTgAD symptomatiques (10-11 mois), le traitement avec la MET (2mg/mL dans l'eau de boisson pendant un mois) a permis de corriger les altérations de la structure des mitochondries (nombre, taille et organisation des crêtes), de réduire les niveaux des APP-CTFs et de l'A β , ainsi que la taille des plaques dans le subiculum et de l'immunoréactivité de l'anticorps AT8 reconnaissant la forme phosphorylée de Tau (pSer202/pThr205). De plus, le traitement à la MET a réduit l'astrogliose et la microgliose dans le subiculum des souris 3xTgAD, tout en stimulant le recrutement des microglies autour des plaques amyloïdes et en réduisant les niveaux plasmatiques de plusieurs cytokines proinflammatoires (TNF- α , INF- γ , IL-6 et IL-1 β).

Dans des coupes organotypiques d'hippocampes de souris transduites avec des lentivirus exprimant l'APP^{swe}, le CC augmente la proportion d'épines dendritiques immatures, tandis que la MET a augmenté la proportion d'épines dendritiques matures. En accord avec ce résultat, la MET a permis d'améliorer les capacités d'apprentissage chez les souris 3xTgAD.

Dans cette étude, nous démontrons l'implication de la cascade de signalisation AMPK-ULK1 dans la structure et le fonctionnement des mitochondries, la mitophagie, les pathologies amyloïdes et Tau, l'inflammation, et la morphologie des épines dendritiques ainsi que l'apprentissage. Nos résultats suggèrent qu'un moyen d'améliorer les dysfonctions de ces paramètres dans la MA pourrait être de stimuler l'AMPK, notamment avec une molécule pharmacologique telle que la MET.

Hampered AMPK-ULK1 cascade instigates mitochondrial dysfunctions, mitophagy and neuroinflammation in Alzheimer's disease

Arnaud Mary ¹, Paula F. Kinoshita^{1,2}, Fanny Eysert¹, Audrey Valverde ¹, Sandra Lacas-Gervais ³, Charlotte Bauer ¹, Sabiha Eddarkaoui^{4, 5}, Anne-Sophie Gay¹, Delphine Debayle¹, Luc Buée ^{4,5}, Valérie Buée-Scherrer ^{4,5}, Frédéric Checler ¹, and Mounia Chami ^{1*}.

* Corresponding author

¹Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, Institute of molecular and cellular pharmacology, Laboratory of excellence DistALZ, 06560, Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

²Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

³Université Côte d'Azur, Centre Commun de Microscopie Appliquée (CCMA), Parc Valrose, 06108, Nice, France.

⁴Univ. Lille, Inserm, CHU-Lille, Lille Neuroscience and Cognition, Place de Verdun, 59045, Lille, France.

⁵Inserm UMR-S 1172, Laboratory of excellence DistALZ, 'Alzheimer and Tauopathies', Bâtiment Biserte, rue Polonovski, 59045, Lille Cedex, France.

Running title: AMPK-ULK1 signaling cascade impacts Alzheimer's disease development

Key words: AMPK, Amyloid beta, APP, Mitochondria, Mitophagy, Neuroinflammation, Tau.

ABSTRACT

Mitochondrial structure and function alterations as well as mitophagy failure are considered early key features culminating bioenergetics defects in Alzheimer's disease (AD) brain patients. Of importance, these alterations are commonly associated with AD-related pathogenic proteins, namely the hyperphosphorylated Tau protein forming intracellular neurofibrillary tangles (NFT), and the accumulation of amyloid precursor protein (APP)-derived toxic amyloid beta ($A\beta$) and C-terminal fragments (APP-CTFs). Besides, chronic neuroinflammation has also a prominent role in AD development. This work was designed to explore in AD the impact of AMPK-ULK1 signaling pathway, considered a key node controlling mitochondria health, mitophagy and neuroinflammation. We reported altered AMPK-ULK1 cascade in human post-mortem sporadic AD brains and in cellular and mice AD models mimicking familial AD. Pharmacological blockade of AMPK in neuroblastoma cells expressing the familial APP Swedish mutation (APP^{swe}) exacerbated mitochondria structure and function alterations and hampered mitophagy process (LC3 activation but reduced targeting of Parkin to mitochondria and mitochondria fusion with lysosomes) along with reduced lysosomes number and enhanced amphisomes and autolysosomes structures. These alterations were associated with enhanced accumulation of APP-CTFs monomeric and aggregated forms and occur independently from $A\beta$. On the contrary, pharmacological activation of AMPK in APP^{swe} cells reduced APP-CTFs and $A\beta$ loads and provides beneficial effects towards mitochondria structure and function without impacting mitophagy. The use of AMPK constitutive active and dominant negative mutants further supported the impact of AMPK on mitochondria function. Interestingly, AMPK pharmacological activation in symptomatic 3xTgAD mice restored mitochondria structure alterations, enhanced lysosomal content, reduced APP-CTFs, $A\beta$ loads and NFT, and alleviated inflammation. AMPK activation also normalized dendritic spines alterations in *ex vivo* organotypic hippocampal slice cultures modeling amyloidogenic APP processing and ameliorated learning deficit in symptomatic 3xTgAD mice. These data provide future directions for AMPK-based therapeutic strategies in AD.

INTRODUCTION

Alzheimer's disease (AD) is linked to neuronal loss culminating in learning and memory deficits in patients [1]. In addition, AD brains feature histopathological alterations including microscopic intracellular lesions named neurofibrillary tangles (NFT) formed by the aggregation of hyperphosphorylated forms of the Tau protein, and extracellular accumulation of toxic amyloid β ($A\beta$) peptides in the senile plaques [2]. Tau is a brain-specific, axon-enriched microtubule-associated protein, while $A\beta$ peptides are the proteolytic products of the amyloid precursor protein (APP) cleavage by the β - and the γ -secretases [3]. Amyloidogenic processing of APP is amplified in familial forms of the disease linked to mutations of *APP* gene and of presenilin 1 (*PSEN1*) and presenilin 2 (*PSEN2*) genes, encoding the catalytic components of the γ -secretase [4]. Besides $A\beta$ -mediated toxicity, recent studies by our laboratory and others pointed-out the role of APP-derived C-terminal fragments (APP-CTFs: C99 and its-derived fragment C83) in AD pathogenesis. APP-CTFs accumulate in human sporadic AD brains and iPSCs carrying APP or PS1 mutations and in transgenic and humanized knock in (KI) AD mice models [5-10] (recently revised in [11]). APP-CTFs triggers, independently from $A\beta$, early synaptic alterations, apathy-like behavior and lysosomal-autophagic pathology [12-16].

Growing evidences describe AD as a consequence of bioenergetics breakdown linked to mitochondrial dysfunctions [17]. Recent studies demonstrated that the failure of mitophagy (a specific process whereby dysfunctional mitochondria are degraded) [18] is a key disease mechanism contributing to AD development [19]. Importantly, deficits of the structure and function of mitochondria and of mitophagy are linked to several AD-related proteins, namely Tau, APOE, $A\beta$ and APP-CTFs [8, 17, 20-22].

Mammalian Adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK), a highly conserved serine/threonine protein kinase, serves as a master sensor of the cellular response to energetic stress that is activated under low-energy conditions to maintain energy homeostasis. AMPK are heterotrimeric complexes composed of catalytic α , scaffolding β and regulatory γ subunits. Activation of AMPK involves the allosteric binding of AMP with the γ -subunit, and the phosphorylation of the α -subunit at Thr172 either by upstream kinases (i.e. LKB1, CaMKK β 2), and/or by the inhibition of protein phosphatases [23, 24]. AMPK activation triggers the inhibition of anabolic reactions including lipid and protein biosynthesis and gluconeogenesis, and steer cells towards increased catabolism by promoting on the one hand glucose, lipids and fatty acids utilization, and on the other hand by the transcriptional upregulation of genes involved in mitochondrial biogenesis, autophagy/mitophagy and lysosomal degradation [25]. Specifically, AMPK-mediated autophagy/mitophagy occurred downstream of the active phosphorylation of Unc-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1); the latter being also controlled by AMPK-mediated phosphorylation of mTOR and its subunit RAPTOR relieving the inhibitory phosphorylation on ULK1 [23]. Active ULK1 phosphorylates in turn the noncanonical IKK family member TANK-binding kinase 1 (TBK1) at Ser172 residue [26]. This is consistent with the observations that both ULK1 and TBK1 play essential roles in autophagy [27, 28]. Importantly, active TBK1 may directly phosphorylates and inhibits AMPK under conditions of over nutrition [26].

AD is also defined by chronic neuroinflammation driven by both the central/innate and peripheral/adaptive immune systems [29]. It becomes evident that deleterious chronic inflammation potentiates neuronal damage and synaptic deficits participating to the disease progression [30, 31]. $A\beta$ peptides deposition in senile plaques instigates anti-inflammatory

immune responses in microglia and astroglia stimulating the phagocytic clearance of A β deposits. As the disease advances, a shift toward chronic inflammatory responses occurred and is mediated by proinflammatory cytokines [31]. Interestingly, recent studies unraveled that multiple targets of AMPK are linked to innate and adaptive inflammatory responses. The anti-inflammatory action of AMPK includes the promotion of microglial polarization from the pro- to anti-inflammatory phenotype. Mechanistically, AMPK indirectly inhibits NF- κ B activation, through multiple downstream pathways including SIRT1, Forkhead box O (FOXO) and PGC1 α , and consequently reduced pro-inflammatory mediators levels including IL-1 β , IL6, and TNF- α [32].

This study reports the alteration of AMPK-ULK1 signaling cascade in human sporadic Alzheimer's brains and in cellular and mice models mimicking familial AD. Of interest, using pharmacological and genetic approaches, we unraveled the impact of AMPK activity on APP processing, mitochondrial structure, function and mitophagy *in vitro* and *in vivo*. Restoring AMPK-ULK1 cascade normalized dendritic spines alterations in *ex vivo* organotypic hippocampal slice cultures modeling amyloidogenic APP processing, and balanced chronic neuroinflammation, and alleviated learning deficit defect in AD mice.

MATERIALS & METHODS

Human brain samples

Studies involving human brains were performed in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical studies. Informed consent for tissue donation for research is obtained by the Brain Bank Neuro-CEB and has been declared at the Ministry of Higher Education and Research (agreement AC-2013-1887) under their approval procedures. We studied control and SAD post-mortem human brains. Cases were anonymized, but information was provided regarding sex, age at death, and neuropathology (Supplementary Table 1).

Animals

3xTgAD mice (APP^{swe}: KM670/671NL, TauP301L, and presenelin1 (PS1) M146V) [33] and wild-type (WT; non-transgenic) mice were housed with a 12:12 h light/dark cycle and were given free access to food and water. All experimental procedures were in accordance with the European Communities Council Directive of 22 September 2010 (2010/63/EU) and approved by the French Ministry of Higher Education and Research (Project number APAFiS#20495-201904231352370) and by Côte d'Azur University Animal Care and Use Committee.

Cell lines and treatments

Human SH-SY5Y cells stably expressing pcDNA3.1 or full-length APP^{swe} constructs were generated, and maintained in the presence of 400 µg/ml geneticin (MP Biomedicals as already described) [34]. Stable inducible SH-SY5Y cell line expressing C99 fragment was obtained and maintained in the presence of 10 µg/ml puromycin (Sigma-Aldrich) as already described [8]. C99 expression was induced by the addition of doxycycline (10 µg/ml) (Sigma-Aldrich) for 48 h. Cells were treated for 6h with Dorsomorphin known also as Compound C (CC) (Abcam) at 10 µM prepared in DMSO, or with metformin-HCl (Met) (Merck-Millipore) at 2 mM prepared in water. DMSO or untreated cells were respectively used as controls.

In vivo pharmacological treatments and mice processing

Nine to ten-month-old 3xTgAD and WT females were treated with metformin hydrochloride (Merck-Millipore, 317240-5GM) at 2 mg/mL in their drinking water during 1 month. For biochemical analyses, brains were isolated and stored in the RNA stabilization reagent (RNAlater, Qiagen) for 24h and then dried and stored at -80°C until use. Total protein extracts were obtained from dissected hippocampi of WT and 3xTgD mice. For immunohistochemistry and electron microscopy analyses, mice were anesthetized with a ketamine/xylazine (87 mg/ml and 13 mg/ml, respectively, 1 ml/kg) mixture, cardially perfused with PBS for 5 min and then with 10 ml of 4% PFA solution (immunohistochemistry) or with 10 ml of 2.5% glutaraldehyde in 0.1M cacodylate buffer (electron microscopy analyses). The whole brains were isolated and further post-fixed overnight at 4°C under agitation. For immunohistochemistry, fixed brains were embedded in paraffin and coronal sections were cut with a sliding microtome (8 µm).

One ml of blood was collected before the cardiac perfusions and was left to coagulate in a collection tube several hours at RT. Tubes were then centrifuged at 10,000g, 20 min at 4°C,

and the supernatant (serum) was collected, snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until use.

Morris water maze and Barnes maze

Spatial learning and memory tests using the Morris Water Maze (MWM) were performed as previously described [35]. Barnes maze was assessed using land-based rodent procedure as already described [36]. This test offers the advantage of being free from the potentially confounding influence of swimming behavior with respect to MWM. Briefly, mice performed three trials during four days on a spatial acquisition protocol allowing animals to retrieve a box placed under a hole of the Barnes Maze apparatus. Several parameters were evaluated in both tests (i.e. latency to reach the target platform or box, number of target quadrant entry, mean speed, and latency to visible platform) using the Animaze 6.1 Software.

Spontaneous activity test

Spontaneous locomotor activity of mice was assessed by recording their activity in an actimeter apparatus (Actimeter system, Imetronic, France) during two consecutive nights (41h of recording). Briefly, the cages were illuminated 12 hours per day starting from 8 A.M. Each cage was equipped with infrared captors at each side of the box and was connected to an electronic interface that allowed the automatic measurement of spontaneous locomotor activity (rearing, front activity, back activity, and locomotion).

Viral production

Lentiviral particles were produced as previously described by co-transfecting two helper plasmids, delta8.9 (packaging vector) and VSV-G (envelope vector) and a transfer vector (pGFP-C-sh Lenti) into Lenti-X 293 T cell line (632,180; Clontech, Mountain View, CA, USA) [37]. We produced Green and Green-APP^{swe} lentiviruses, cloned in the lentiviral vector with an IRES-ZsGreen fluorescent tag (pHAGE-CMV-MCS-IRES-sGreen, under the control of the CMV promoter and wild type AMPK α_2 (WT-AMPK), AMPK α_2 constitutively active form (CA-AMPK) obtained by the truncation after aa 312 residue and dominant negative K45R AMPK α_2 mutant (AMPK-DN) cloned in SIN-PGK-cPPT-RFA-WHV lentiviral vector, under the control of the PGK promoter (mutants were sub-cloned from Addgene plasmid 159991-Morris J. Birnbaum [38]). Viral titers were assessed using p24 ELISA (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA).

Organotypic hippocampal slices preparation and culture

Hippocampal slices were obtained from C57bl6JRj mice (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France) 5 to 7 days after birth. Brains were quickly dissected out to retrieve hippocampi from both hemispheres, sliced onto 400 μ m sections and kept into slicing medium [Earles' Balanced Salt solution (EBSS; 97.5%) and EBSS-HEPES (2.5%)]. Slices were transferred on sterile hydrophilic membrane millicell discs (Millipore, FHLC01300) placed in semiporous cell culture inserts (Millipore, 0.4 μ m) containing culture medium (Minimum Essential Medium Eagle (MEM) + Glutamax-1 (50%), EBSS (18%), EBSS (13%)/D-glucose (5%), penicillin–streptomycin 5000U/ml (1%), Horse serum (25%) and Nystatin 10000U/ml (0.06%). Two hours after plating, slices were infected with lentiviruses encoding for Green or Green-APP^{swe} proteins, respectively. Slices were kept at 37°C, with 5% CO₂ for 9 days before imaging analysis. Slices were kept at 37°C, 5% CO₂ for 9 days before treatments and imaging

experiments. For treatments, slices were incubated for 6h with 2 mM Met or 10 μ M CC. Control slices were untreated or treated with DMSO for 6h.

Imaging of dendrites and quantitation of spine morphology

Slices were left attached on the millicell membranes and mounted with mounting solution, cover-slipped and dried before imaging. Spine morphology was assessed with LSM 780 microscope, Plan-Apochromat 63 \times /1.40 Oil DIC M27 lens, zoom 3.0 and pinhole at 52 μ m on ten to twenty different dendrite segments (obtained from two independent experiments). The quantification of spine structures (filopodia, immature, and mature) was performed manually using ZEN software as we already described [36].

DAB and Immunofluorescence staining

Mice brain sections were deparaffined in xylen bath and rehydrated by successive 5 min baths of EtOH 100% (2 times), 90%, and then 70%. Antigens were unmasked in a 90% formic acid bath for 5 min for 82E1 antibody (recognizing A β and C99 and not holo-APP), or for 30 min in citric acid solution pH6 at 90-100 $^{\circ}$ c (Pressure cooker, Vector Laboratories) for 82E1 (1/800; IBL America)) and anti-Iba1 (1/1000, FUJIFILM Wako Chemicals) co-staining, and for Iba1, GFAP (1/1000, Novus Biologicals), or AT8 (recognizing pSer/Thr205-Tau (1/1000, Thermo Fisher Scientific)) stainings. Non-specific binding sites were blocked for 1h in 5% BSA, 0.05% Triton in PBS solution. Sections were incubated at 4 $^{\circ}$ C overnight with primary antibodies. After three washes with PBS supplemented with 0.02% tween, sections were incubated for one hour with adequate secondary horseradish peroxidase antibodies (Interchim, Montluçon, France) for Iba1, GFAP and AT8 stainings and then revealed with the DAB-ImmPACT system (Vector Laboratories), rinsed, counterstained with cresyl violet, and mounted in Isomount 2000 medium (VWR Chemicals). 82E1 and Iba1 co-staining was revealed after incubation for one hour with adequate secondary antibodies coupled with Alexa-488 or Alexa-594 fluorophores (1/1000, Molecular Probe). Nuclei were stained with DAPI (1/5000, Invitrogen) and slides were mounted with Vectamount medium (Vector). Images were taken with a confocal Leica TCS SP5 microscope (Immunofluorescence) or with DMD108 Leica microsystem (DAB) and processed using ImageJ software.

Transmission electron microscopy

For ultrastructure analysis, cells were fixed in 1.6% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer (pH 7.4), rinsed with cacodylate buffer 0.1 M, and then post-fixed in osmium tetroxide (1% in cacodylate buffer) reduced with potassium ferricyanide (1%) for 1 h. Fixed mice brains were sliced (200 μ m) on a vibratome. Two mm³ cubes from the subiculum were microdissected under binoculars and post-fixed in osmium tetroxide (1% in cacodylate buffer 0.1 M). Cells and tissue were dehydrated with several incubations in increasing concentrations of ethanol or acetone, respectively, and embedded in epoxy resin (EPON), and 70 nm ultrathin sections were contrasted with uranyl acetate and lead citrate and observed with a Transmission Electron Microscope (JEOL JEM 1400) operating at 100 kV and equipped with an Olympus SIS MORADA camera. We used ImageJ software to analyze mitochondria ultrastructure and to measure mitochondria perimeter, area and number.

Protein extraction and SDS-PAGE analysis

Total protein extracts were prepared from cells, dissected mice hippocampi, or human temporal cortex using lysis buffer (50 mM Tris pH 8, 10% glycerol, 200 mM NaCl, 0.5%

Nonidet p-40, and 0.1 mM EDTA) supplemented with protease inhibitors (Complete, Roche diagnostics). Full-length APP, APP-CTFs, and A β were resolved on 16.5% Tris-Tricine SDS-PAGE then transferred onto nitrocellulose membranes. Membranes were boiled in PBS, saturated in TBS, 5% skimmed milk, and incubated overnight with specific antibodies. All the other proteins were resolved by SDS-PAGE following standard procedures. Information about the primary antibodies can be found in Supplementary Table 2.

A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ sandwich ELISA tests

The concentrations of human A β ₁₋₄₀ and A β ₁₋₄₂ were measured in total protein extract of hippocampi and in sera of mice, or in the culture medium of SH-SY5Y APPswe after CC or metformin treatment, by using the respective ELISA kits (Invitrogen) following the manufacturer's instructions.

V-Plex Proinflammatory Panel 1 Mouse kit

Levels of interferon (IFN)- γ , interleukin (IL)-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12p70, KC/GRO, and tumour necrosis factor (TNF)- α , were analyzed using the V-PLEX Proinflammatory Panel 1 Mouse Kit (MSD Cat#K15048D), according to the protocol supplied by the manufacturer. IL-4 and IL-12p70 data were not included since their level was below the background level.

Measurements of mitochondrial superoxide and of mitochondrial potential

MitoSOX Red is a highly selective dye detecting superoxide in the mitochondria of living cells [8]. Cells were incubated in 5 μ M MitoSOX red mitochondrial superoxide indicator (Invitrogen) in DMEM for 30 min, at 37 °C, 5% CO₂. Cells were harvested and rinsed twice with ice cold HBSS complemented with 1 mM CaCl₂ and 0.5 mM MgCl₂. Tetramethyl rhodamine methyl ester (TMRM) is a cell-permanent dye that accumulates in active mitochondria with intact membrane potentials. Loss of mitochondrial membrane potential triggers reduced TMRM accumulation. Cells were harvested, rinsed with PBS, and incubated in TMRM (prepared in DMEM) (2 nM) for 30 min at 37°C, 5% CO₂. TMRM and MitoSOX fluorescence median intensities were then analyzed in the Novocyte Flow Cytometer (ACEA bioscience, Inc) excitation/emission 510 nm/580 nm.

To demonstrate specific TMRM and MitoSox binding, cells were respectively treated with the mitochondrial uncoupler FCCP (trifluoromethoxy carbonyl cyanide phenylhydrazine), or with 10 μ M oligomycin (ATPase inhibitor) (Abcam) and 1 μ M antimycin A (inhibitor of cytochrome C reductase) (Sigma-Aldrich) for 6h.

Measurements of cytosolic calcium concentration

Cytosolic calcium concentrations were measured using the cytosolic aequorin-targeted probe in control and APPswe SH-SY5Y cells remained untreated or treated with DMSO, 2 mM Met or 10 μ M CC for 6h. The luminescence was analyzed in Varioskan after a stimulus of carbachol (500 μ M). The calibration was done in Ca²⁺ (1 mM) rich solution containing digitonin (100 μ M) as already described [34].

Mitophagy analysis

SH-SY5Y APPswe cells plated on glass coverslip were transfected with Mit-RFP probe alone or in combination with LC3-GFP or LAMP1-GFP using lipofectamine. Cells were fixed 48h later with 4% PFA for 20min and were subjected (where indicated) to immunostaining with

Parkin antibody as already described [8]. Cells were observed, with Leica SP5 with a 63X objective. Images were processed with ImageJ to quantify the colocalization (JACoP: Just Another Colocalization Plug-in), particle analyzes, and signal integrated intensities.

Statistical analyses

Data were expressed as means \pm SEM. Sample size for each experiment is indicated in the figure captions. We studied control ($n = 6-7$) and SAD ($n = 12-13$) human brains by SDS-PAGE. Cells analyses were obtained in at least three independent experiments in duplicates or triplicates, while the quantification of imaging experiments was performed on different (> 5) fields of view. The number of mice hippocampi and cells used in SDS-PAGE analyses is specifically indicated in figures legends, electron microscopy analyses were performed in 2 different mice/condition and immunofluorescence in 3 different mice/condition. Data were analyzed with GraphPad Prism version 9 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; <https://www.graphpad.com>). Data were first analyzed for normal distribution. We used the Mann–Whitney test when the two groups of variables have not passed the normality test. Groups of more than two variables that have passed normality test were analyzed by one-way ANOVA with Dunnett’s or Tukey’s multiple comparisons post-test. Kruskal–Wallis test and Dunn’s multiple comparisons post-test was used when groups of variables have not passed the normality test. Correlations were analyzed with Spearman’s correlation coefficient. Significant differences are: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$, $***P < 0.001$, $****P < 0.0001$ and ns: non-significant. For MWM and Barnes Maze, latencies were analyzed using InVivoStat software, by mixed model ANOVA with repeated measures (genotype \times treatment \times training day) and followed by post-hoc comparisons with Holm correction of the P -value for multiplicity.

RESULTS

AMPK-ULK1 cascade is hampered in human Alzheimer's brains and in AD cellular models

AMPK signaling cascade was first examined in human sporadic Alzheimer's brains and in age-matched controls (Supplementary Table 1). We reported an enhancement of p(Thr172)AMPK and of p(Thr172)/total AMPK ratio in AD brains, while the level of total AMPK remained unchanged (Figure 1A, B). Intriguingly, AD brains show unchanged levels of total ULK1 and of its active phosphorylated form p(Ser555)ULK1, occurring downstream of AMPK activation (Figure 1A, C). Similarly, the level of total TBK1, and of its phosphorylated form p(Ser172)TBK1 were also unchanged between controls and AD brains (Figure 1A, D). We further investigated the potential correlation between the increase of p(Thr172)/total AMPK ratio and A β or APP-CTFs load in our brains cohort. As expected, we first observed enhanced A β and APP-CTFs content in AD versus control brains (Figure 1E). Interestingly, we revealed significant positive correlations of p(Thr172)/total AMPK ratio with both A β and APP-CTFs increases (Figure 1F, G). We then investigated the AMPK signaling cascade in two cellular AD study models (i.e. the neuroblastoma cells expressing APP_{swE} accumulating several APP-derived fragments namely APP-CTFs and A β , and cells expressing C99 fragment in an APP wild type genetic background) [8, 34]. We first confirmed the overexpression of APP_{swE} and of C99 fragments and reported enhanced APP-CTFs accumulation in both models (Figure 2A, E respectively). Surprisingly and comparatively to AD brains, we reported a drastic reduction of p(Thr172)AMPK and of p(Thr172)/total AMPK in APP_{swE} expressing cells (Figure 2A, B). This was associated with a reduction of the AMPK downstream targets materialized by reduced p(Ser555)/total ULK1 ratio (Figure 2A, C), and of p(Ser172)/total TBK1 (Figure 2A, D). C99 expressing cells feature as in human AD brains enhanced p(Thr172)/total AMPK ratio and unchanged p(Ser555)/total ULK1 ratio. However, these cells harbour enhanced p(Ser172)TBK1 and p(Ser172)/total TBK1 ratio (Figure 2E, H). Even if these data may point out inconsistent changes regarding AMPK activation (phosphorylation state), they converge all towards a blockade (human brains and C99 expressing cells), or a repression (APP_{swE} expressing cells) of its direct downstream target ULK1.

Targeting AMPK signaling impact APP processing, mitochondrial structure, function and mitophagy process in APP_{swE} expressing cells

We then sought to study the impact of the pharmacological and genetic modulation (blockade and activation) of AMPK in APP_{swE} expressing cells. We first showed that pharmacological AMPK blockade with Dorsomorphin, or Compound C (CC) (an ATP-competitive AMPK inhibitor) triggered, as expected, a repression of AMPK-ULK1 cascade (reduced p(Thr172)AMPK and p(Ser555)ULK1 and of the ratio versus their respective total AMPK and ULK1 levels) (Figure 3A-C). Intriguingly, CC treatment enhanced p(Ser172)TBK1 and p(Ser172)/total TBK1 ratio (Figure 3A, D), likely contributing to AMPK inactivation. On the contrary, the pharmacological AMPK activation by metformin (Met) (known to reduce the ATP/AMP ratio through the blockade of mitochondrial Complex I) enhanced p(Thr172)AMPK and p(Ser555)ULK1 and the ratio versus their respective total AMPK and ULK1 levels (Figure 4A-C), without affecting TBK1 phosphorylation state (data not shown). Then, we showed that while CC induced a huge accumulation of APP-CTFs monomers and aggregates (Figure 3A, E) and reduced extracellular A β 1-40 and A β 1-42 levels (Figure 3F), Met reduced both APP-CTFs monomers and extracellular A β 1-42 levels (Figure 4A, D and

E). These observations led us to postulate that CC-mediated AMPK-ULK1 cascade blockade could trigger cellular toxic features associated with excessive APP-CTFs accumulation, likely in an A β -independent manner, as we recently reported upon γ -secretase blockade [8], and that Met treatment may potentially avert toxic effects linked to both APP-CTFs and A β 1-42 accumulation.

To ascertain these hypotheses, we investigated the impact of CC and Met treatments on mitochondrial structure, function and mitophagy in APPswe cells. We previously reported that APPswe expressing cells exhibited reduced number of mitochondria characterized by enhanced size respective to their controls [8]. Electron microscopy analyses demonstrated that CC triggers a drastic reduction of mitochondria area associated with enhanced mitochondria number as compared to vehicle treated control cells (Figure 5A-C). Met treatment moderately but significantly reduced mitochondria area and enhanced mitochondria number (Figure 5F-H). As already reported, we further observed reduced mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_{mit}$) and enhanced mitochondrial ROS (mitROS) accumulation in APPswe expressing cells [8] (Figure 5J, K). We thus analyzed these parameters upon CC and Met treatment. While CC treatment triggered $\Delta\psi_{mit}$ hyperpolarization and further exacerbate mitROS levels, Met restored $\Delta\psi_{mit}$ to a level similar to that in control cells without affecting mitROS (Figure 5J, K). We also reported enhanced mitROS and $\Delta\psi_{mit}$ in control cells treated with CC but not in those treated with Met (Supplementary Figure 1A, B), confirming toxic effect of AMPK blockade on mitochondria function. We demonstrated the relevance of these findings by using a constitutive-active (CA-AMPK: AMPK α 1-312), and a dominant-negative (DN-AMPK: AMPK α K45R) AMPK lentiviral constructs. First and as expected, we showed that expression of CA-AMPK enhanced p(Thr172)AMPK and of p(Thr172)/total AMPK ratio versus APPswe cells expressing AMPK α wild type subunit (WT-AMPK) (Supplementary Figure 2A, B). On the contrary, the expression of DN-AMPK triggers a significant reduction of the AMPK downstream target p(Ser555)ULK1 and its ratio versus total ULK1 level (Supplementary Figure 2A-C). Importantly, DN-AMPK exacerbated mitochondrial dysfunction as does CC and enhanced both $\Delta\psi_{mit}$ and mitROS, while CA-AMPK expression partially restored mitochondria function, by reducing mitROS levels without affecting $\Delta\psi_{mit}$ (Supplementary Figure 2D, E). Supporting our previous study [34], we observed enhanced carbachol-evoked cytosolic calcium signals ($[Ca^{2+}]_{cyt}$) in APPswe cells ($8.67 \pm 0.27 \mu M$, n=14) as compared to control cells ($3.40 \pm 0.61 \mu M$, n=10) (Figure 5L). Met but not CC slightly but significantly reduced carbachol-evoked $[Ca^{2+}]_{cyt}$ signals in APPswe expressing cells ($7.07 \pm 0.24 \mu M$, n=14 in Met-treated cells, and $8.17 \pm 0.21 \mu M$, n=9 in CC-treated cells) (Figure 5L). We next investigated the effect of CC and Met treatments on mitophagy. Electron microscopy analyzes showed that CC treatment reduced the number of lysosomes and inversely enhanced number of amphisomes/autolysosomes without affecting the number of autophagic vacuoles (AVs) in APPswe cells (Figure 5D, E). These data are in accord with a defective mitophagy phenotype as further demonstrated by a decrease of parkin targeting to mitochondria (Figure 3G, H), an increase of LC3-GFP punctae number (Figure 3G, I) and a reduced targeting of dysfunctional mitochondria to lysosomes revealed by a decrease of the colocalization of LAMP1-GFP probe with mi-RFP probe (Figure 3G, J). Our data also suggest a reduction of lysosomal function in CC-treated APPswe cells since we observed a reduction of the number of lysosomes and an increase of the number of autolysosomes/amphisomes in APPswe cells treated with CC versus control ones (Figure 5D, E). However, Met treatment did not change the number of AVs and lysosomes, (Figure, 5D,

I). It also did not impact the number of amphisomes/autolysosomes (Figure 5D) being low in APPsw untreated cells (Figure 5E). Consistently, Met enhanced parkin level (Figure 4F, G), but has no effect on parkin targeting to mitochondria (Figure 4F, H), on LC3-GFP punctae number (Figure 4F, I) and the colocalization of LAMP1-GFP probe with mi-RFP probe (Figure 4F, J).

Together, the data demonstrated that while the activation of AMPK-ULK1 cascade may prevent mitochondrial structure and function defects obtained in a cellular AD study model, the blockade of AMPK-ULK1 cascade exacerbates.

Together, these data demonstrated that AMPK blockade exacerbate mitochondrial structure and function alterations and mitophagy failure phenotype in a cellular AD study model. Since we unraveled some beneficial effects associated with AMPK activation in AD cells, we thought to investigate the impact of AMPK activation *in vivo*.

Rebalancing AMPK-ULK1 cascade defect in 3xTgAD mice restored mitochondria structure alterations and enhanced lysosomal content

As reported in human AD brains (Figure 1) and in cellular AD models (Figure 2), we showed defective AMPK-ULK1 cascade in the brains of symptomatic 3xTgAD mice aged 11 months (accumulating APP-CTFs and A β) characterized by enhanced p(Thr172)AMPK and of p(Thr172)/total AMPK ratio (Figure 6A, B), a repression of p(Ser555)ULK1 and of p(Ser555)/total ULK1 ratio (Figure 6A, C) and enhanced p(Ser172)TBK1 and p(Ser172)/total TBK1 ratio (Figure 6A, D).

The toxic effect of CC reported in cells (Figure 3 and 5); prompt us to focus our study on Met in mice. We thus treated wild type (control) and symptomatic 3xTgAD mice aged 10 months with Met (2mg/ml in the drinking water for 1 month). We first confirmed AMPK and ULK1 active phosphorylations under our experimental protocol (Figure 7 A, B) and studied mitochondrial morphology and size in the subiculum area of control and AD mice untreated or treated with Met. As we previously reported in aged 3xTgAD mice [8], we observed a reduction of mitochondrial number and enhanced mitochondria area in the soma of neurons of untreated 3xTgAD mice (Figure 7C-E). Interestingly, these mitochondrial morphological changes were reversed by Met treatment (Figure 7C-E). We then identified two mitochondria types, were type I corresponds to mitochondria with uniform matrix filled with dense packed regular distributed cristae, and type II corresponds to mitochondria showing morphological abnormalities, ranging from focal loss of cristae with empty spaces to severe loss of cristae and reduced matrix density (Figure 7F). The quantification of mitochondria types revealed reduced mitochondria type I in the profit of enhanced mitochondria type II in 3xTgAD mice neurons. Importantly, the treatment with Met significantly reversed mitochondria shape towards type I in 3xTgAD mice while having no effect in control mice (Figure 7C, F, G). In parallel, while we did not notice any change in the number of AVs being low in both control and 3xTgAD mice treated or not with Met (Figure 7H, I), we reported an enhancement of the number of lysosomes in Met-treated 3xTgAD mice as compared to non-treated 3xTgAD mice and to control mice treated or not with Met (Figure 7H, I).

Activation of AMPK-ULK1 cascade in 3xTgAD mice ameliorates A β and Tau pathologies and rebalances chronic inflammation

In the same group of mice, we analyzed the impact of Met treatment on APP processing and Tau hyperphosphorylation status. SDS-PAGE analyses revealed that Met significantly reduced the levels of APP-CTFs and of A β in the subiculum of 3xTgAD mice without

affecting full length APP level (Figure 8A, B). Accordingly, 3xTgAD mice treated with Met show reduced 82E1 (recognizing the C99 and A β peptides) integrated signal intensity and total signal area (Figure 8C, D), reduced A β plaque area (Figure 8E and see representative images of A β plaques in C(a-d) and C(e-h)). Accordingly, Met reduced A β 1-40 and A β 1-42 peptides levels in hippocampal total protein extracts (Figure 8 F). We also reported a decrease of Tau Ser202/Thr205 phosphorylation revealed by reduced number of AT8 positive cells (Figure 8G, H and I), and of AT8 integrated intensity (Figure 8G, H and J) in 3xTgAD mice treated with Met. The levels of phosphorylated Tau at Ser199, Thr231 and Ser396 residues was enhanced in 3xTgAD versus control mice (data not shown), but were not significantly impacted by Met treatment as analyzed versus total Tau (Figure 8K), or versus hTau (Figure 8L).

We then addressed the question about the impact of Met treatment on innate neuroinflammation mediated by microglia and astrocytes. We revealed an enhancement of Iba1⁺ cells (microglia) (Figure 9A, B) and of GFAP⁺ cells (astrocytes) in 3xTgAD mice Subiculum (Figure 9D, E) that were significantly reduced by Met (Figure 9A, B, D, E). We also evidenced in 3xTgAD mice an enhancement of active-like microglia (Iba1⁺ cells characterized by amoeboid and dense nuclei and reduced branching) that was reversed by Met treatment (Figure 9A, C). This microglia morphological change may support a rescue of microglial phagocytic activity. In fact, we quantitatively reported enhanced recruitment of microglia in the vicinity (within 25 μ m radius) of amyloid plaques in 3xTgAD mice treated with Met (Figure 9F, G).

We also examined peripheral cytokine protein profiles in the serum of WT and 3xTgAD mice treated or not with Met and reported a significant enhancement of peripheral cytokines TNF- α , INF- γ levels and an increase tendency of IL6 and IL-1 β levels in 3xTgAD versus WT mice serum (Figure 9H). Importantly, Met treatment significantly reduced the levels of TNF- α , INF- γ , IL-6 and IL-1 β cytokines in the serum of 3xTgAD mice (Figure 9H). However, we did not notice any change in the levels of KC/GRO chemokine, and of IL-2, IL-5, and IL-10 cytokines levels in the serum of 3xTgAD mice versus WT mice, and they all were not affected by Met treatment (Figure 9H). To note, the levels of IL-12p70 and of IL-4 cytokines were almost undetectable in the serum of both WT and 3xTgAD mice (data not shown).

Activation of AMPK-ULK1 cascade alleviates learning deficit in 3xTgAD mice and ameliorates dendritic spines alterations in organotypic hippocampal slice cultures

The 3xTgAD mice display cognitive alterations in memory and learning tasks [35, 36] that are characteristic defects observed in AD patients. We sought to determine whether Met may impact the spatial learning and memory using the Morris Water Maze (MWM) and Barnes Maze (BM) tests, two spatial learning tests, as readout of learning tasks [35, 36]. We reported that the average latencies to find the hidden platform were increased in untreated 3xTg-AD and that Met treatment significantly improved the escape latency compared to untreated 3xTgAD mice, while having no effect in WT treated mice (Figure 10A). We then assessed probe trial 24 h after the last acquisition day to examine long-term memory and revealed as we already reported [35, 36] that 3xTgAD mice exhibited reduced number of quadrant and target entries compared to untreated WT mice (Supplementary Figure 3A). However, Met treatment failed to normalize these parameters (Supplementary Figure 3A). Of importance, the observed deficits in the MWM in 3xTgAD mice and the impact of Met on learning abilities in 3xTgAD mice were not due to defects in swimming speed (Supplementary Figure 3B), or vision (Figure 10B). Similarly, 3xTg-AD mice exhibited enhanced latencies to target

box in the less stressful BM test that were normalized in Met-treated 3xTgAD mice (Figure 10C). We described an apathy-like behavior in 3xTgAD mice characterized by a decrease in spontaneous locomotor activity assessed using an actimeter apparatus [15, 39]. We thus compared the total and continuous activity of the mice during 2 consecutive nights, including frontal activity, back activity, rearing, and locomotion. We first confirmed that total activity of 3xTgAD mice was significantly decreased compared to WT mice (Figure 10D, F left) and that this decrease was even more pronounced when we examined rearing activity (Figure 10E, F right). Met treatment did not impact total and rearing activities in both WT and 3xTgAD mice (Figure 10D-F). All over, these analyses revealed beneficial effect of AMPK activation towards learning ability in 3xTgAD mice, likely attributable to restored synaptic deficits.

We thus addressed the question about the functional consequences of targeting AMPK on synaptic plasticity through the analyses of the morphology of dendritic spines. To this aim, we used organotypic hippocampal slices cultures (OHSC) prepared from young wild type mice (P5-P6) that were infected with lentiviruses expressing Green protein or APP_{swe} expressed together with Green protein with IRES system (APP_{swe}-Green) [36, 40] (Figure 10G). Infected OHSC were then treated with vehicle, CC or Met (Figure 10G). Dendrite imaging allowed us to visualize and index three morphological types of spines reflecting their degree of maturity, i.e. mature spines (M), immature stubby spines (I) or filopodia (F) (Figure 10H). As already reported [36], the comparison of Green and APP_{swe}-Green infected OHSC revealed a drastic reduction of the number of mature (M) spines concomitant to a significant increase in the number of filopodia type (F) spines in APP_{swe}-Green infected slices (Figure 10G, H). Importantly, Met treatment increased the number of mature (M) and reduces that of filopodia (F) spines observed in APP_{swe}-Green slices (Figure 10G, H), indicating that AMPK activation accounts for dendritic spines maturation in AD. To note, we did not notice an impact of Met in Green slices (Figure 10G, H). On the contrary, CC-mediated AMPK blockade triggers a defect in dendrite spines maturation in both APP_{swe}-Green and Green OHSC characterized by an increase of the number of immature (I) spines and a reduction of filopodia (F) spines in APP_{swe}-Green OHSC, and by increased immature (I) and decreased mature (M) spines in Green OHSC (Figure 10G, H). Together, these data suggest that while AMPK blockade may exacerbate synaptic deficits, its activation prevents synaptic alteration likely impacting cognitive functions in AD.

DISCUSSION

Several studies indicate that AMPK signaling cascade is altered in aging and in AD [41, 42]. AMPK α_2 mRNA and pThr172-AMPK α_2 levels were found to be gradually decreased during aging in the hippocampi of WT mice and in 12-month-old 3xTgAD mice [41]. An inhibition of AMPK was also noticed in the type-2 cannabinoid receptor (CB2R) Knockout mice displaying AD-like tau hyperphosphorylation and hippocampus-dependent memory impairment [42] and in 7-month-old APP/PS1 AD mice brains [43]. Another study rather observed an activation of AMPK in APP/PS1 mice aged 10-12 months, correlating with Akt inhibition and LKB1 activation [44]. This study also reported an activation of AMPK in AD brains at Braak's stage VI [44]. Accordingly, Fang *et al.* also reported AMPK activation in SAD brains associated with downstream inhibition of both ULK1 and TBK1 [45]. Together these studies converge to demonstrate a blockade of AMPK and/or of its downstream effectors in aging and in AD. Our results are in agreement with this statement, as we observed an activation of AMPK in SAD brains in the absence of ULK1 and TBK1 activation, thus suggesting an AMPK signaling cascade blockade. Furthermore, AMPK-ULK1 cascade blockade was similarly observed in two AD cellular models and in symptomatic 3xTgAD mice aged 11 months. One mechanism that could explain how an increase of pThr172-AMPK α levels does not result in the activation of its downstream targets was previously reported upon TNF- α treatment inducing a concomitant increase of the phosphorylation of the activation (Thr172) and inhibition (Tyr436) AMPK residues, resulting in a lack of ULK1 phosphorylation [46].

Pharmacological inhibition of AMPK by CC in APP_{swe} cells triggered an important accumulation of monomeric as well as aggregated APP-CTFs, and caused mitochondrial fragmentation. Moreover, both CC treatment and DN-AMPK expression resulted in mitochondrial function impairments (i.e. hyperpolarization and enhanced ROS production). These later alterations are consistently linked with mitophagy impairment [47]. Hence, CC treatment also induced mitophagy inhibition, characterized by a reduction of Parkin recruitment to mitochondria, an accumulation of autophagic vacuoles, and by a blockade of mitochondria fusion with lysosomes. Intriguingly, CC treatment mimic the effects we previously observed after the pharmacologic inhibition of the γ -secretase and are thus likely attributable to APP-CTFs accumulation, independently from A β [8]. In fact, as previously stated, CC exacerbated APP-CTFs accumulation and reduced A β ₁₋₄₂ and A β ₁₋₄₀ levels.

Oppositely, the pharmacologic activation of AMPK with Met elicited a reduction of APP-CTFs accumulation and of A β ₁₋₄₂ level in APP_{swe} cells and in the hippocampi of 3xTgAD mice. This result is in accordance with previous studies reporting beneficial effects of AMPK pharmacologic stimulation towards amyloid pathology [43, 48, 49]. Noticeably, this was linked to different mechanisms including a reduction of BACE-1 [48], an increase of insulin degrading enzyme levels [43], or an enhancement of autophagy [49]. However, other studies rather reported that Met may increase Amyloidogenic APP processing through enhanced APP, BACE-1, and PS1 (γ -secretase) levels or by promoting amyloidogenic A β PP processing in autophagosomes, resulting in enhanced APP metabolism and production of C99 and intracellular and extracellular A β *in vitro* and *in vivo* [50-52]. The causes of these discrepancies are still unknown.

The reduction of APP-CTFs and A β load in our symptomatic 3xTgAD mice may likely be due to increased autophagic and lysosomal degradation. Indeed, we reported an increase number of lysosomes in hippocampal neuronal soma of Met-treated 3xTgAD mice. AMPK activation with resveratrol similarly stimulates the autophagic and lysosomal degradation of

A β through the inhibition of mTOR [53]. As a matter of fact, CC-mediated AMPK blockade is associated with APP-CTFs accumulation in APP^{swe} cells and triggers a decrease of lysosomes number and an accumulation of amphisomal and autolysosomal vesicles containing non-degraded materials.

Activated AMPK abnormally accumulated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in all major tauopathies [54]. We reported enhanced p(Thr172)AMPK in 3xTgAD mice aged 11 months and demonstrated that Met reduced pSer202/pThr205-Tau staining in hippocampal neurons. Several studies have also concluded in favor of AMPK stimulation as a way to reduce Tau pathology in AD. *In vitro* treatment of human cortical stem cells with the AMPK activator (AICAR) reduced the phosphorylation levels of Tau on Thr231, Ser199/202, and Ser396 [55]. Similarly, Met treatment in 9 month-old APP/PS1 mice, injected with aggregated Tau in the hippocampus, reduced pTau (Ser202/Thr205, Thr231 and Ser422) levels through an enhancement of microglial phagocytosis and clearance of pTau [49]. STZ-mice overexpressing AMPK also showed reduced pThr231- and pSer396-Tau levels and memory deficits [41]. As for amyloid pathology, the benefit of AMPK activation on Tau pathology is also questioned. *In vitro*, AMPK activation by AICAR, Met or A β ₁₋₄₂ treatment enhanced Tau phosphorylation on multiple residues, thus impairing Tau ability to bind to microtubules [56, 57]. In addition, AMPK α 2 deficiency reduced tau pathology in the PS19 mouse model [57]. However, besides pSer202/pThr205Tau, Met treatment did not change the phosphorylation state of Tau residues (Ser199, Thr231 and Ser396) in 3xTgAD mice, supporting the contribution of complementary AMPK-independent signaling cascades to Tau phosphorylation in this model.

Met increased mitochondria number and slightly decrease the mean mitochondrial area in APP^{swe} cells. These observations are consistent with the role of AMPK in mitochondria biogenesis and fission. Hence, the activation of AMPK seems also to rescue the mitochondrial swelling phenotype present in this model [58]. Of interest, Met similarly reduced mitochondria number, increased their size and prevented the impairment of cristae morphology in symptomatic 3xTgAD mice. Accordingly, in human neural stem cells, the A β ₁₋₄₂-induced morphological damages of mitochondria were also shown to be normalized by a Met treatment [59]. Functionally, AMPK pharmacological and genetic activation prevented both mitochondrial membrane depolarization and excessive ROS production in APP^{swe} cells. In AD, the amyloid pathology is associated with deleterious chronic neuroinflammation [29]. *In vivo*, amyloid plaque load was reduced in 3xTgAD mice treated with Met likely through the stimulation of the microglial clearance. Moreover, we reported that Met reduced hippocampal microgliosis and astrogliosis, and peripheral pro-inflammatory cytokine (TNF- α , IFN- γ , IL1- β et IL-6) levels. Similarly, Met was shown to reduce microgliosis, astrogliosis, and the release of pro-inflammatory molecules in the hippocampus of APP/PS1 mice [48]. In rat model injected with streptozotocin (STZ) modeling SAD, Met or Met-loaded phosphatidylserine nanoliposomes intraperitoneal injections, similarly resulted in an anti-inflammatory outcome, stimulating microglia clearance capacities and reducing hippocampal gliosis [60, 61]. Mechanistically, Met was shown to enhance the acidification of lysosomal/endosomal compartments and the phagocytic capacities of resting or activated rat microglia *in vitro* [62].

Synaptic plasticity alterations and loss of synapses are major features of AD, that correlate with the cognitive impairments. In our OHSC infected with APP^{swe} lentiviruses, AMPK inhibition resulted in a decrease proportion of mature dendritic spines, but in an increase of the immature ones. Reversely, AMPK activation reduced the proportion of immature dendritic

spines. In two behavioral tests (MWM and Barne's maze) metformin treatment improved the spatial learning capacities of symptomatic 3xTgAD mice. These results support the ones obtained in APP^{swe}/Ind mice, administered with Met in drinking water at the same concentration for 8 months [63], and those obtained in APP/PS1 females and STZ-rats [48, 60]. Other drugs activating AMPK (AICAR and resveratrol), analogously dampen spatial memory defects in STZ-rats and CB2R^{-/-} mice [64, 65]. However, under our experimental protocol, Met failed to restore memory deficit. A longer Met treatment is likely necessary to correct memory failure in our 3xTgAD mice.

Altogether, our data are in favor of benefic use of AMPK activation as a potential treatment to alleviate several AD dysfunctions, including APP-CTFs and A β accumulations, pathological Tau phosphorylation, mitochondrial structure and function alterations, dendritic spine morphology perturbations, inflammation, and learning deficits. Of interest, in a phase II clinical trial (NCT01965756), Met tested on a limited number of MCI or AD patients with mild dementia [66] showed significant improvements of executive functions and a trend amelioration towards learning, memory and attention. Met is already prescribed for type II diabetes mellitus (T2DM), considered as a risk factor of developing AD. Strikingly, T2DM patients treated with Met have significantly reduced risk to develop cognitive impairments and dementia [67]. Thus, AMPK signaling cascade modulation must be seriously taken into account as an alternative therapeutic approach for AD.

Figure 1. AMPK-ULK1 signaling cascade is altered in post-mortem human SAD brains. Representative SDS-PAGE (A) and the quantitative graphs (B-D) showing protein levels of p(Thr172)AMPK, total AMPK, p(Ser555)ULK1, total ULK1, p(Ser172)TBK1, and total TBK1 and the ratio of the phosphorylated forms of AMPK, ULK1 and TBK1 versus respective total proteins in the total homogenates of temporal lobe of SAD (n=12-13) and control (n=6-7) brains (patients information in Supplementary Table 1). Actin was used as loading control. (E) Quantitative graph representing A β and APP-CTFs expression levels in AD and control brains. (B-E) Graphs represent means \pm S.E.M versus control brains (taken as 1). (F, G) Correlation plots between p-AMPK/AMPK ratio and A β (F), or APP-CTFs (G) levels in controls (black dots) and AD (white dots) brains. Linear regression was used to determine *P* and goodness of fit (R^2) values. * *P* <0.05, *** *P* <0.001, **** *P* <0.0001 and ns: non-significant using Mann Whitney test.

Figure 2. AMPK-ULK1 signaling cascade is altered in SH-SY5Y cells expressing APP_{swe} or C99 fragment. Representative SDS-PAGE (A, E) and the quantitative graphs (B-D, F-H) showing full-length APP, APP-CTFs (i.e. C99 and C83), p(Thr172)AMPK, total AMPK, p(Ser555)ULK1, total ULK1, p(Ser172)TBK1, and total TBK1 protein levels and the ratio of the phosphorylated forms of AMPK, ULK1 and TBK1 versus respective total proteins in APP_{swe} expressing cells (n = 4-8) versus control cells (n = 6-10) expressing empty vector (A-D) and in C99 expressing cells (n = 4) versus control cells (n = 3) (E-H). Actin was used as loading control. Graphs represent means \pm S.E.M versus control cells (taken as 1). * *P* <0.05, ** *P* <0.01, **** *P* <0.0001 and ns: non-significant using Mann Whitney test.

Figure 3. AMPK-ULK1 cascade blockade impacts APP processing and mitophagy in APP_{swe} expressing cells. Representative SDS-PAGE (A) and the quantitative graphs (B-E) showing full-length APP, monomeric (Mono) and aggregated (Agg) APP-CTFs (i.e. C99 and C83), p(Thr172)AMPK, total AMPK, p(Ser555)ULK1, total ULK1, p(Ser172)TBK1, and total TBK1 protein levels and the ratio of the phosphorylated forms of AMPK, ULK1 and TBK1 versus respective total proteins in APP_{swe} expressing cells treated with Compound C (CC) (10 μ M) for 6h (n = 4-6), or treated with vehicle for 6h (control) (n = 4-6). Actin was used as loading control. (F) A β 40 and A β 42 levels detected by ELISA in the conditioned media of APP_{swe} treated as in (A). Graphs represent means \pm S.E.M versus control treated cells (taken as 1). (G) Representative images of APP_{swe} cells transiently transfected with mit-RFP probe (red) and stained with anti-Parkin (green), or transfected with mi-RFP probe (red) in combination with LC3-GFP or LAMP1-GFP reporters (green) and treated as in (A). Images show merge of green and red signals reflecting the colocalization in yellow. Nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bars represent 5 μ m. (H-J) Graphs represent Pearson's colocalization coefficient of endogenous parkin with mitochondria (mitRFP) (H), and of LAMP1-GFP with mit-RFP signals (J), and the number of LC3-GFP punctae obtained in vehicle (control) and CC treated APP_{swe} cells. Graphs represent means \pm SEM obtained from two to three independent experiments (n = 30-69 cells in controls, and n = 53-71 cells in CC). (B-F, and H-J) * *P* <0.05, ** *P* <0.01, **** *P* <0.0001 and ns: non-significant using Mann Whitney test.

Figure 4. AMPK-ULK1 cascade activation impacts APP processing but not mitophagy in APP_{swe} expressing cells. Representative SDS-PAGE (A) and the quantitative graphs (B-D) showing full-length APP, monomeric (Mono) and aggregated (Agg) APP-CTFs (i.e. C99

and C83), p(Thr172)AMPK, total AMPK, p(Ser555)ULK1, and total ULK1 protein levels and the ratio of the phosphorylated forms of AMPK, ULK1 versus respective total proteins in APPswe expressing cells treated with metformin (Met) (2mM) for 6h (n = 4-7), or untreated (control) (n = 4-7). Actin was used as loading control. (E) A β 40 and A β 42 levels detected by ELISA in the conditioned media of APPswe treated as in (A). Graphs represent means \pm S.E.M. versus control cells (taken as 1). (F) Representative images of APPswe cells transiently transfected with mi-RFP probe (red) and stained with anti-Parkin (green) or transfected with mi-RFP probe (red) in combination with LC3-GFP or LAMP1-GFP reporters (green) and treated as in (A). Images show merge of green and red signals reflecting the colocalization in yellow. Nuclei were labeled with DAPI (blue). Scale bars represent 5 μ m. (G-J) Graphs represent parkin integrated intensity in arbitrary unit (G), pearson's colocalization coefficient of endogenous parkin with mitochondria (mitRFP) (H), and of LAMP1-GFP with mit-RFP signals (J), and the number of LC3-GFP punctae obtained in control and Met treated APPswe cells. Graphs represent means \pm SEM obtained from two independent experiments (n = 31-65 cells in controls, and n = 26-62 cells in Met). (B-E, and G-J) ** $P < 0.01$, and ns: non-significant using Mann Whitney test.

Figure 5. AMPK-ULK1 cascade modulation impacts mitochondrial structure and function in APPswe expressing cells. (A, F) Electron microscopy ultrastructure of APPswe expressing cells treated for 6h with vehicle or CC (10 μ M) (A), or untreated and treated with Met (2mM) (F). Scale bars correspond to 2 μ m. N: nucleus. Colored arrowheads indicate mitochondria (yellow), lysosomes (red), autophagic vacuoles (AVs) (purple) and amphisomes/autolysosomes (blue). (B, C, G, H) Quantitative graphs of the means \pm SEM of the mitochondria number/10 μ m² (B, G) and area (μ m²) (C, H) in APPswe expressing cells treated as in (A), or as in (F). (D) Representative images of lysosomes, AVs and amphisomes/autolysosomes. Scale bars correspond to 0.5 μ m. (E, I) Quantitative graphs of the means \pm SEM of the number/100 μ m² of lysosomes, AVs and amphisomes/autolysosomes in APPswe expressing cells treated as in (A) or as in (F). (J, K) Graphs representing MitoSox (J) or TMRM (K) median intensities obtained by FACS analyses in cells expressing empty vector (control) and in APPswe expressing cells untreated or treated for 6h with vehicle, CC (10 μ M) or Met (2mM). Median fluorescence intensities are expressed as means \pm SEM versus control (taken as 1) obtained from at least 3 independent experiments in triplicates. (L) Carbachol (500 μ M)-mediated cytosolic Ca²⁺ responses (μ M) were obtained using AdCMVcytAEQ probe. Representative curves \pm SEM of cells expressing empty vector (control) (n = 9), APPswe (n = 17), APPswe + CC (n = 9), and APPswe + Met (n = 12). (B, C, E, G, H, I) ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ and ns: non-significant using Mann Whitney test. (J, K) * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ and ns: non-significant using krustal-Wallis and Dunn's multiple comparisons post-test.

Figure 6. AMPK-ULK1 signaling cascade is altered in symptomatic 3xTgAD hippocampi. Representative SDS-PAGE (A) and the quantitative graphs (B-D) showing p(Thr172)AMPK, total AMPK, p(Ser555)ULK1, total ULK1, p(Ser172)TBK1, and total TBK1 protein levels and the ratio of the phosphorylated forms of AMPK, ULK1 and TBK1 versus respective total proteins in the hippocampi of 11 month-old wild type (WT) (n = 8) and 3xTgAD (n = 8) mice. Actin was used as loading control. Graphs represent means \pm S.E.M versus WT mice (taken as 1). (B-D) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and ns: non-significant using Mann Whitney test.

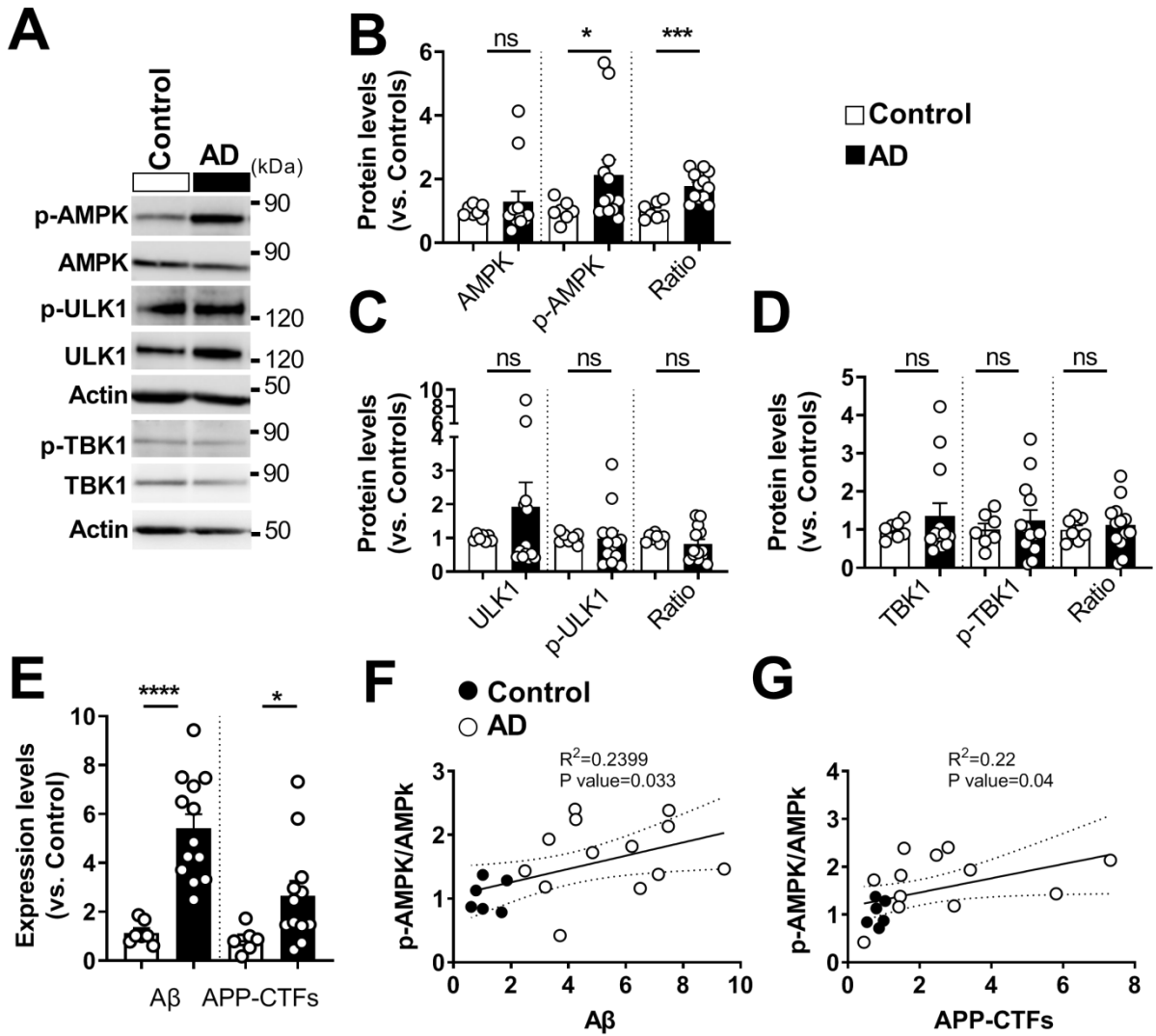
Figure 7. Activation of AMPK-ULK1 signaling cascade impacts mitochondrial and lysosomal number and structures. Representative SDS-PAGE (A) and the quantitative graphs (B) showing p(Thr172)AMPK, total AMPK, p(Ser555)ULK1, and total ULK1, protein levels and the ratio of the phosphorylated forms of AMPK, and ULK1 versus respective total proteins in the hippocampi of 11 month-old 3xTgAD mice untreated (H₂O) (n = 4) or treated with Met (2mg/ml) in the drinking water (n = 4) for one month. Actin was used as loading control. Graphs represent means \pm S.E.M versus WT mice (taken as 1). (C) Electron microphotographs of neuronal soma of WT and 3xTgAD mice untreated (H₂O) or treated with Met as in (A). N: nucleus. Scale bars represent 2 μ m. Green and orange arrows indicate mitochondria types I and II respectively, shown in representative images in (F), scale bars represent 0.5 μ m. (D, E, G) Quantitative graphs of the means \pm SEM of mitochondria number/10 μ m² (D), area (μ m²) (E), and type I and II mitochondria (G). Data were obtained in four mice/condition in two independent experiments (> 20 analyzed field, >100 of mitochondria). (H) Representative images of lysosomes, and autophagic vacuoles (AVs), scale bars represent 0.5 μ m. (I) Quantitative graph of the means \pm SEM of the number/100 μ m² of lysosomes and AVs in neuronal soma of mice treated as in (C). (B) * $P < 0.05$, and ns: non-significant using Mann Whitney test. (D, E, G, I) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$, and ns: non-significant using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test.

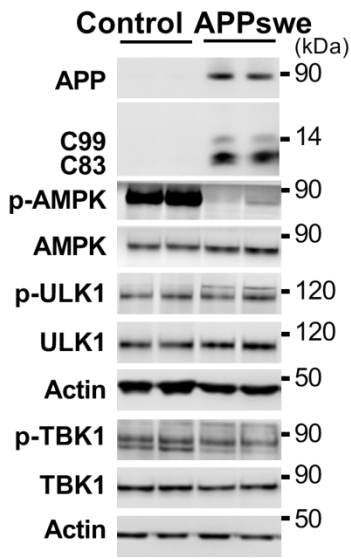
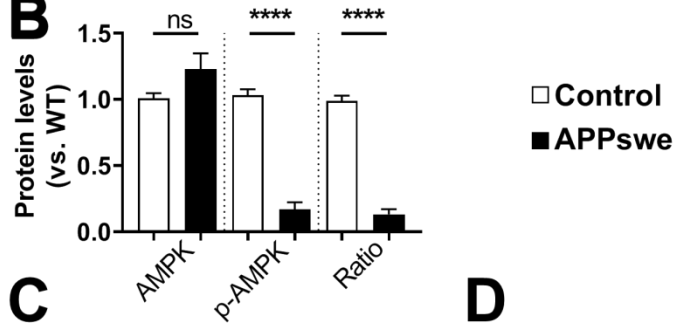
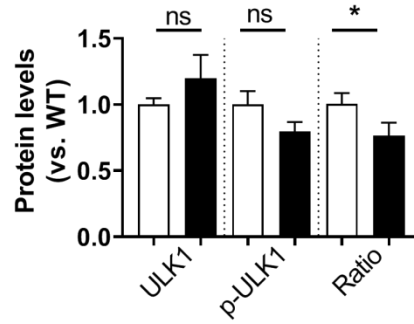
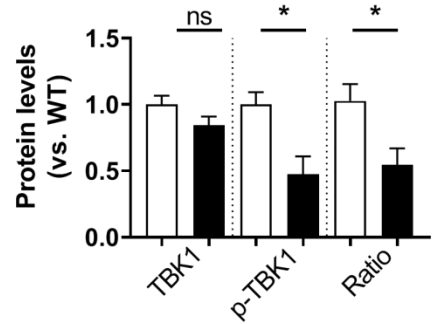
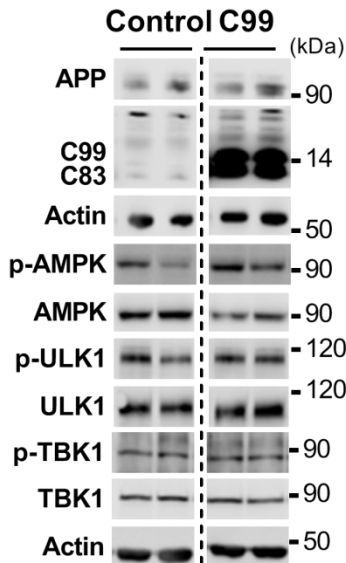
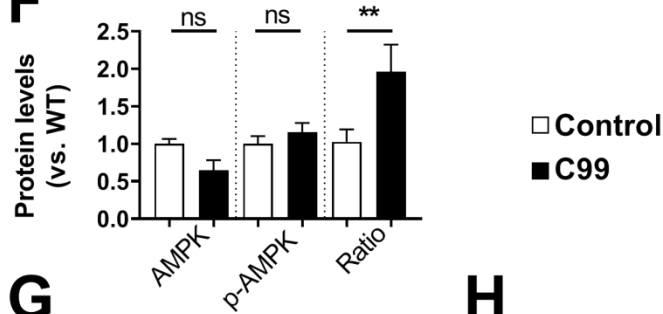
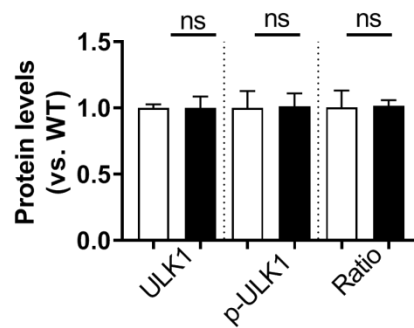
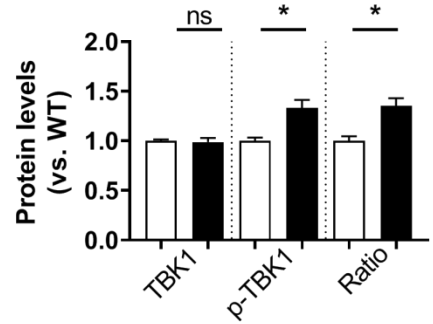
Figure 8. Metformin reduces β amyloid and Tau pathologies in 3xTgAD mice. Representative SDS-PAGE (A) and the quantitative graphs (B) showing Full-length APP (APP), APP-CTFs (i.e. C99 and C83), and A β levels in the hippocampi of 11 month-old wild type (WT) and 3xTgAD (AD) mice untreated (H₂O) or treated with Met (2mg/ml) in the drinking water for one month (WT + H₂O, n = 5; WT + Met, n = 5; AD + H₂O, n = 9; AD + Met, n = 9). Actin was used as loading control. (C) Representative images showing 82E1 fluorescent signal in the hippocampus (subiculum area) of 3xTgAD mice treated or not with Met. Representative images showing amyloid plaques in AD + H₂O (a, b, c, d) and in AD + Met (e, f, g, h). (D, E) Quantitative graphs of 82E1 signal area and integrated intensity (D) and of A β plaque area (μ m²) (E) \pm S.E.M obtained from 3 slices of 3 different mice. (F) Levels of A β 1-40 and A β 1-42 (pg/mg \pm S.E.M) detected by ELISA in hippocampi homogenates of AD + H₂O (n = 8) and AD + Met (n = 7). (G) Representative images showing AT8 signal (recognizing Ser202/Thr205 Tau epitopes) in the hippocampus (subiculum area) of 3xTgAD mice treated or not with Met. (H) Representative images showing AT8 signal in individual neurons of AD + H₂O (i, j) and in AD + Met (k, l). (I, J) Quantitative graphs of AT8 positive cells (I) and of AT8 integrated signal intensity (J) \pm S.E.M obtained from 3 slices of 3 different mice. (K, L) Levels (% versus 3xTgAD + H₂O) \pm S.E.M of phosphorylated Tau species (Ser199, Thr231, Ser396) detected by ELISA in hippocampi homogenates of AD + H₂O (n = 14) and AD + Met (n = 14). (B) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, and ns: non-significant using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test. (D, E, F, I-L) * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, and ns: non-significant using Mann Whitney test.

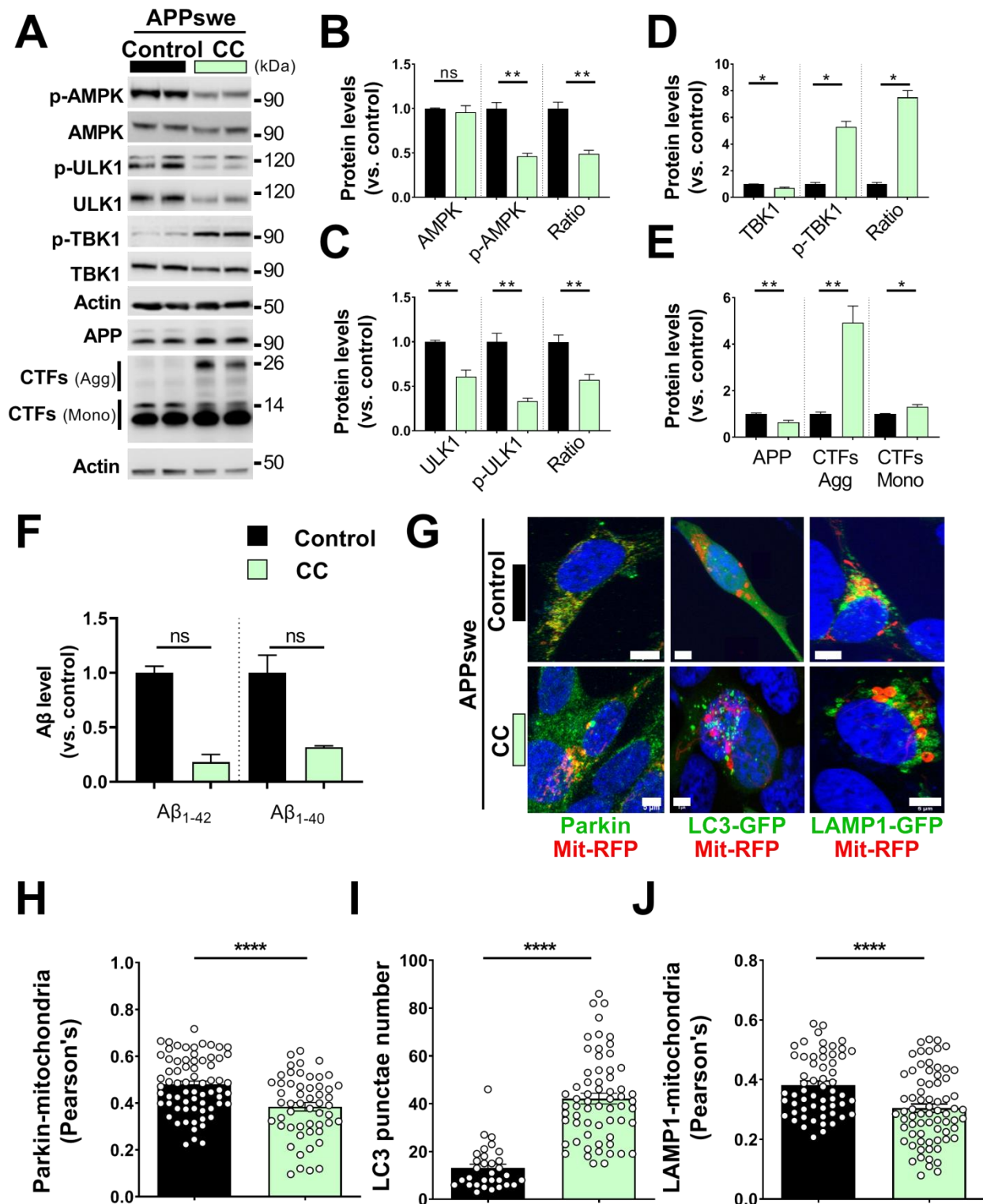
Figure 9. Metformin alleviates innate and adaptive immunity in 3xTgAD mice. (A) Representative images showing Iba1 staining in the hippocampus (Subiculum area) of WT and 3xTgAD untreated (H₂O) or treated with Met (2mg/ml) in the drinking water for one month. Scale bars represent 500 μ m or 50 μ m. (B, C) Quantitative graph of Iba1 positive cells (Iba1⁺) \pm S.E.M (B) and of active-like "A" and quiescent "Q" microglia \pm S.E.M (shown in

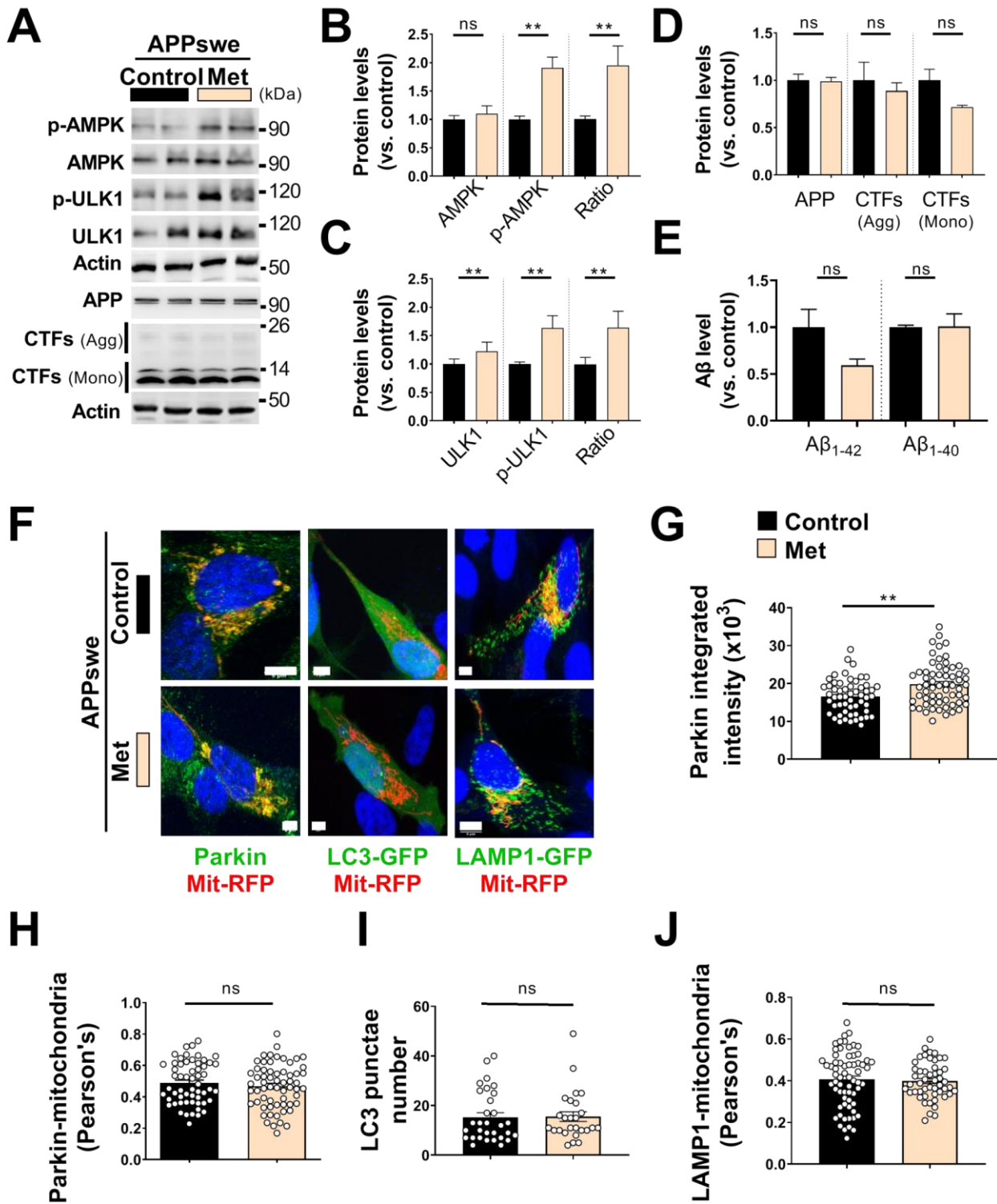
representative images) (C) obtained from 3 slices of 3 different mice. (D) Representative images showing GFAP staining in the hippocampus (Subiculum area) of WT and 3xTgAD treated as in (A). Scale bars represent 500 μ m or 50 μ m. (E) Quantitative graph of GFAP positive cells \pm S.E.M. (F) Representative images showing 82E1 and Iba1 costaining in 3xTgAD treated or not with Met. The recruitment of microglia around A β plaques (25 μ m radius: yellow circle) is highlighted in merge, Iba1 and converted mask images. (G) Quantitative graph of Iba1 signal area in <25 μ m radius \pm S.E.M is obtained from 3 different mice (AD + H₂O, n = 18 plaques, and AD + Met (n = 26) plaques). (H) Levels of inflammatory markers in the serum of WT + H₂O (n = 5), AD + H₂O (n = 5) and AD + Met (n = 6). (B, C, E, H) * P <0.05, ** P <0.01, **** P <0.0001 and ns: non-significant using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test. (G) ** P <0.01, and ns: non-significant using Mann Whitney test.

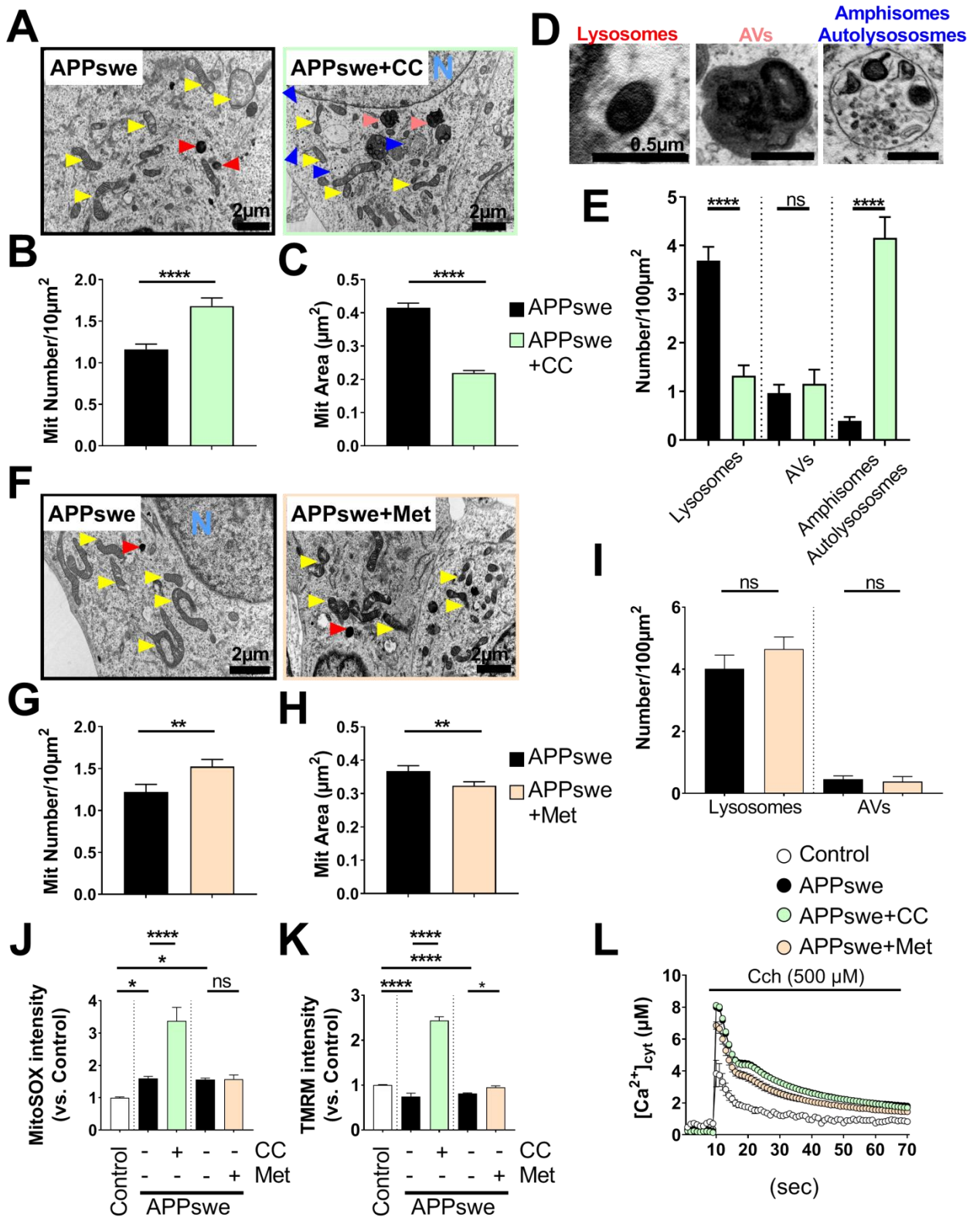
Figure 10. Metformin restores learning ability of 3xTgAD mice and reduces spine morphology alterations in *ex vivo* organotypic hippocampal slice cultures expressing APP^{swe}. (A, B) Latencies to non-visible platform (A) and to visible platform (B) in the MWM test (WT + H₂O, n = 18; WT + Met, n = 20; AD + H₂O, n = 18; AD + Met, n = 20). (C) Latency to find the target hole in BM test (WT + H₂O, n = 10; WT + Met, n = 9; AD + H₂O, n = 12; AD + Met, n = 14). Data are expressed as means of 4 trials per day (D) \pm SEM (A) and of 3 trials in the visible test (B). (D, E) Spontaneous locomotor total activity (D) or rearing (E) waveforms recorded each 20 minutes in the same group of mice used in BM test. (F) Graphs represent the means \pm SEM of total activity (left) or rearing (right) per 20min recorded during 70h. (G) Representative images of organotypic hippocampal slices and of dendritic segments infected with Green or APP^{swe}-Green lentiviruses and treated with vehicle, Met (2mM) or CC (10 μ M) for 6h. Scale bars represent 1 μ m. (H) Graph quantifying spine morphology types \pm SEM (F: filopodia, I: immature, and M: mature) obtained from different dendrites (Green + Vehicle, n = 17; Green + Met, n = 15 Green + CC, n = 15 APP^{swe}-Green + Vehicle, n = 14; APP^{swe}-Green + Met, n = 14; and Green-APP^{swe} + CC, n = 13) from two different slices. (A, B, C) * P <0.05, ** P <0.01 comparing WT + H₂O and AD + H₂O groups and # P <0.05 and ## P <0.01 comparing AD + H₂O and AD + Met groups, according to a mixed model ANOVA (genotype, treatment and day training), Benjamini-Hochberg correction. (F, H) ** P <0.01, *** P <0.001, **** P <0.0001 and ns: non-significant using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test.



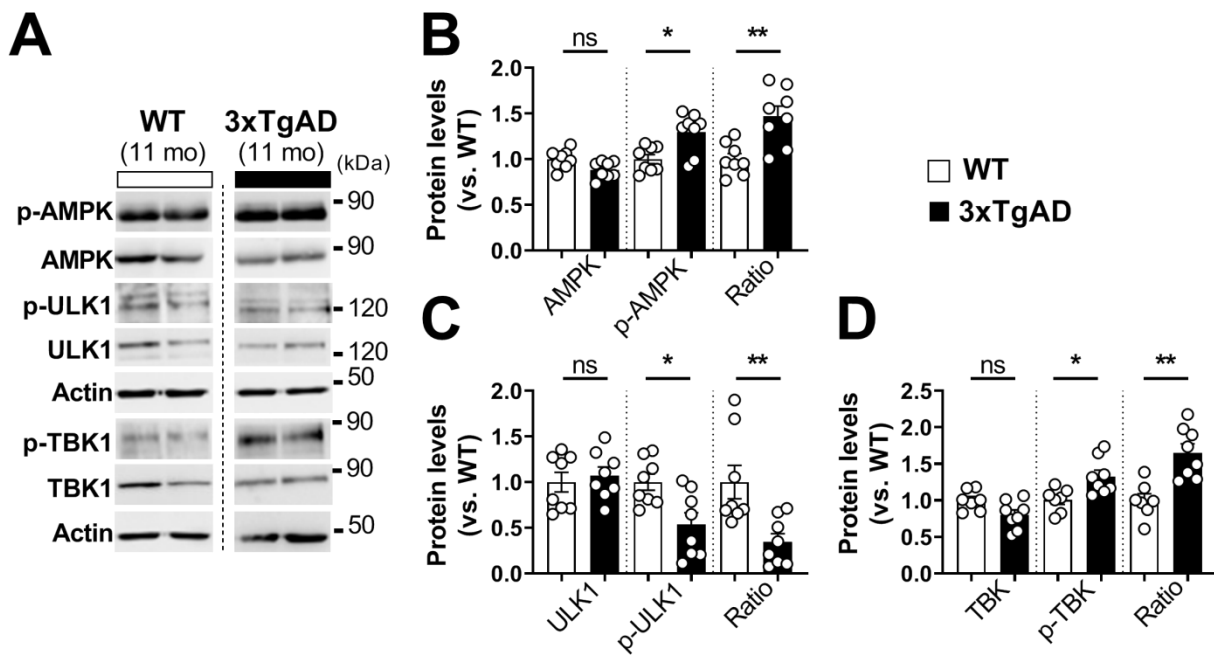
A**B****C****D****E****F****G****H**

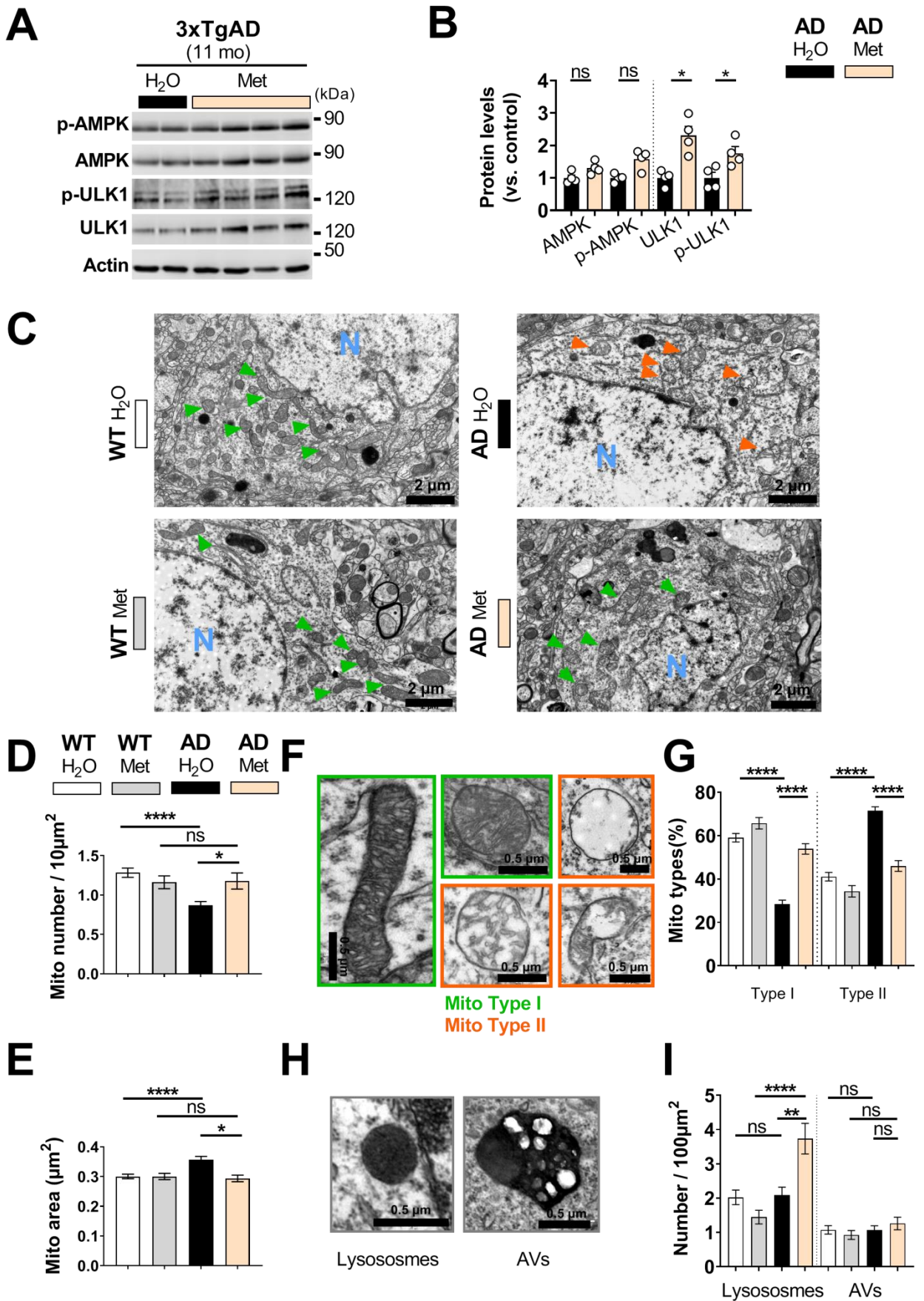




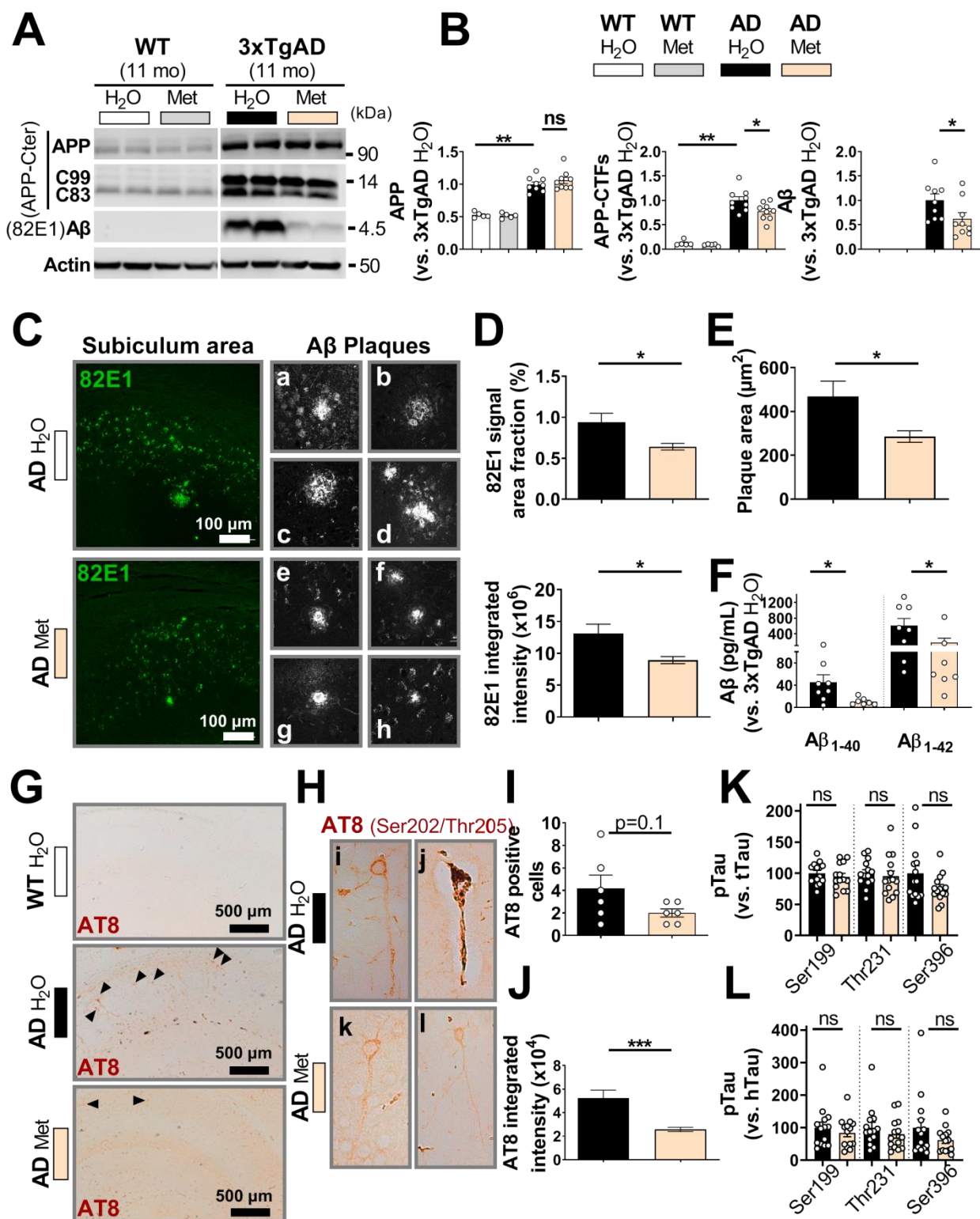


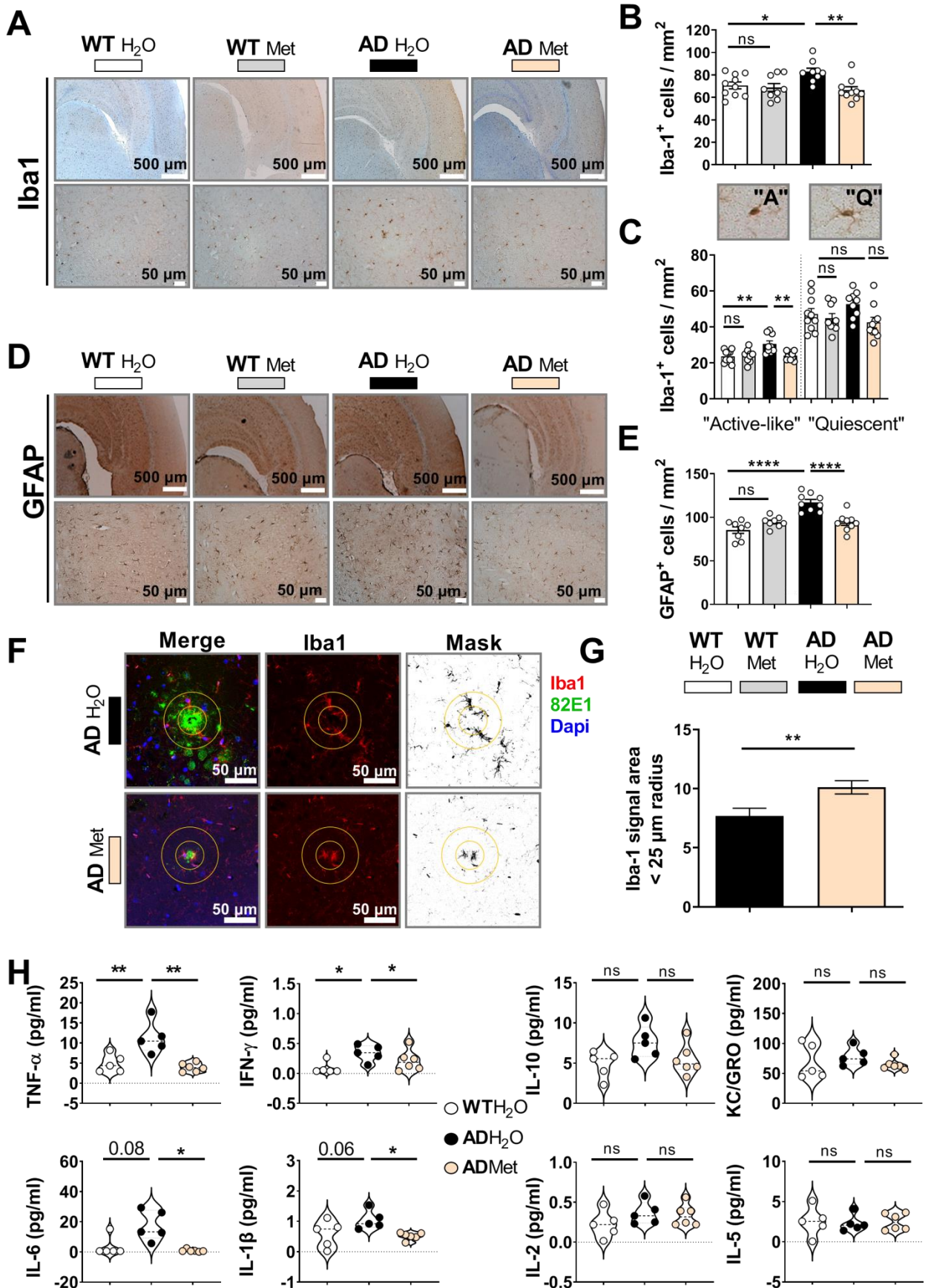
Mary et al. Figure 5



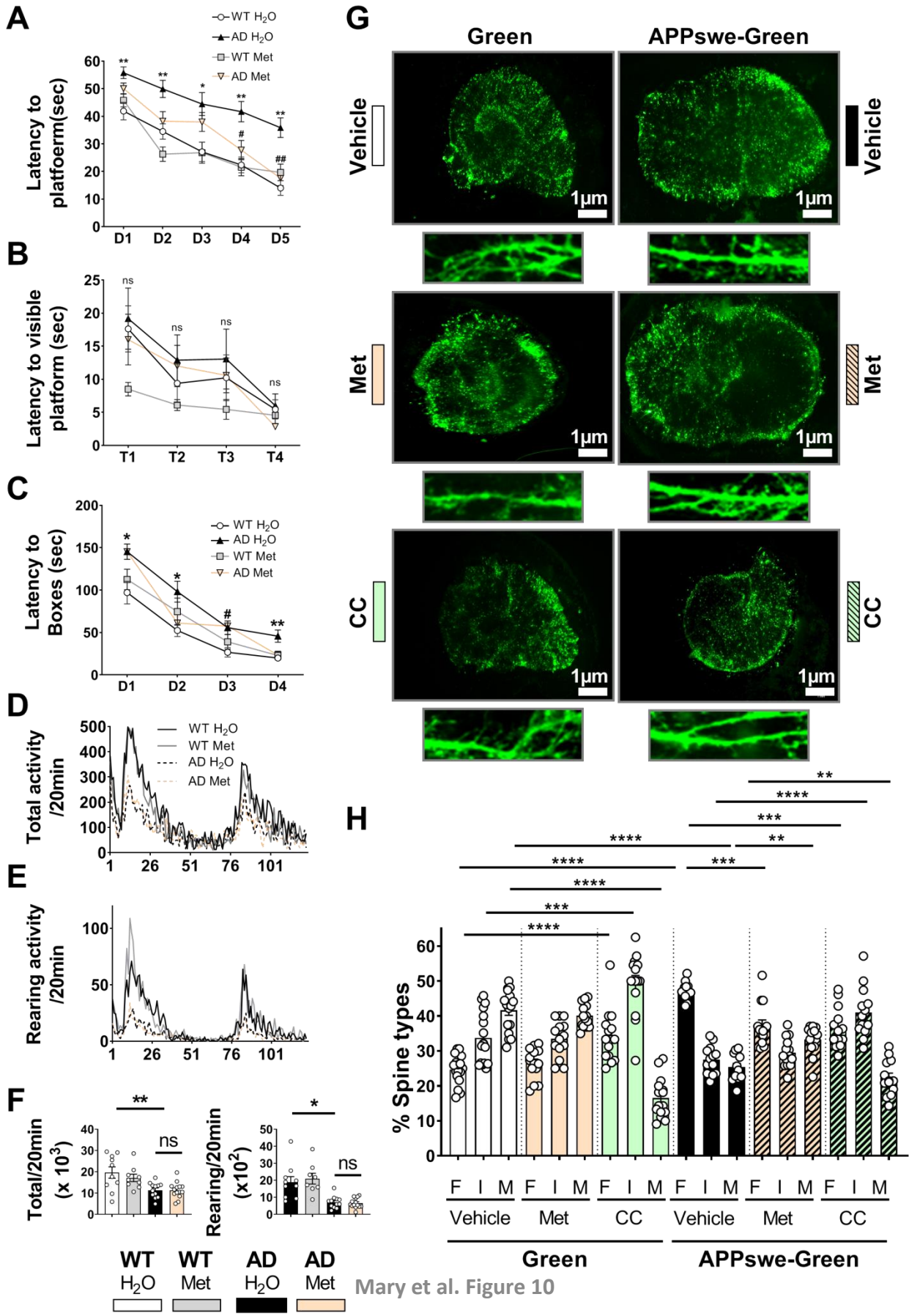


Mary et al. Figure 7





Mary et al. Figure 9



Mary et al. Figure 10

Acknowledgements

This work was supported by Inserm (MC, and FC), Fondation Vaincre Alzheimer (grant # FR18-035) (MC), LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease) (FC and LB), São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grant #2018/14289-6) (PFK). We acknowledge PhD fellow support from DISTALZ to AM. We acknowledge the University's CCMA, Electron Microscopy facility supported by Université Côte d'Azur, the "Conseil Régional Sud Est PACA", the "Conseil Départemental 06" and GIS IBiSA, and we thank Christelle Boscagli for technical help.

Author Contributions

MC conceived and designed the study, analyzed data and wrote the manuscript. FC supports the project, discussed data and edited the manuscript. AM conducted and analyzed all the experiments and participated to manuscript writing. AV participated to organotypic hippocampal slice cultures experiments. PFK performed calcium analyses. FE participated to biochemistry analyses. CB maintained mice colonies. SLG conducted electron microscopy experiments. ASG and DD performed and analyzed proteomic data. SE, LB and VBS performed and analyzed Tau ELISA experiments.

Compliance with ethical standards

Ethical approval

We follow applicable international, national, and institutional guidelines for the care and use of animals. Experimental procedures performed in studies involving animals were approved by Nice university Animal care and use Committee, and the National Council on animal care of the Ministry of Health (Project n°: APAFIS#20495-201904231352370) in accordance with the guidelines established by the European community council (Directive of November 24th, 1986) and with the ethical standards and animal welfare committee of our institute.

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical studies. Brain samples were obtained from the Brain Bank "Neuro-CEB" run by a consortium of Patients Associations: ARSEP (association for research on multiple sclerosis), CSC (cerebellar ataxias), and France Parkinson. The consents were signed by the patients themselves or their next of kin in their name, in accordance with the French Bioethical (agreement AC-2013-1887). Cases were anonymized but information was provided regarding sex, age at death, and neuropathology (Suppl.Table 1).

Informed consent

Informed consent for tissue donation for research is obtained by the brain banks under their approval procedures.

Conflict of interest

Authors declare no conflict of interest

Supplementary Table 1: Demographic data and neuropathological findings related to human brain samples used in SDS-PAGE analyses (T1 region of the temporal lobe). PMD: Post mortem delay, h: hours, NA: not available. Controls are brain samples isolated from post-mortem patients diagnosed as negative for several neuropathologies. ALS are brain samples diagnosed as negative for AD pathology obtained from pos-mortem patients diagnosed with Amyotrophic lateral sclerosis, and used as controls. Neuropathological characterization includes: Braak and Braak's NFT (neurofibrillary tangle: Tau-related pathology) stage, (-) means no NFT detection, Thal A β phase, and amyloid angiopathy.

	Gender	Age (years)	PMD (h)	NFT Braak's stage	Thal phase	Amyloid angiopathy
Control	Male	71	26	-	-	NA
Control	Male	84	32	-	-	NA
Control	Female	71	15	-	3	2
Control	Female	60	28	-	0	0
Control	Female	89	12	-	NA	NA
ALS	Female	62	44	-	0	0
ALS	Male	55	21	-	1	0
AD	Female	89	26	Stade VI	NA	NA
AD	Female	81	60	Stade IV	NA	NA
AD	Female	80	51	Stade V	NA	NA
AD	Female	84	81	Stade IV	4	2
AD	Female	65	41	Stade VI	5	1
AD	Male	81	19	Stade VI	NA	NA
AD	Female	75	7	Stade VI	5	2
AD	Female	93	21	Stade VI	NA	NA
AD	Female	91	34	Stade VI	5	1
AD	Female	55	58	Stade VI	5	1
AD	Female	81	NA	Stade VI	5	1
AD	Female	82	NA	Stade VI	4	1
AD	Male	86	32	Stade VI	5	1

Supplementary Table 2: List of antibodies used in the study.

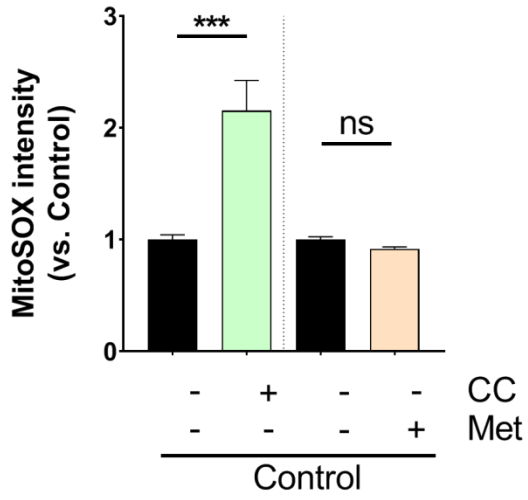
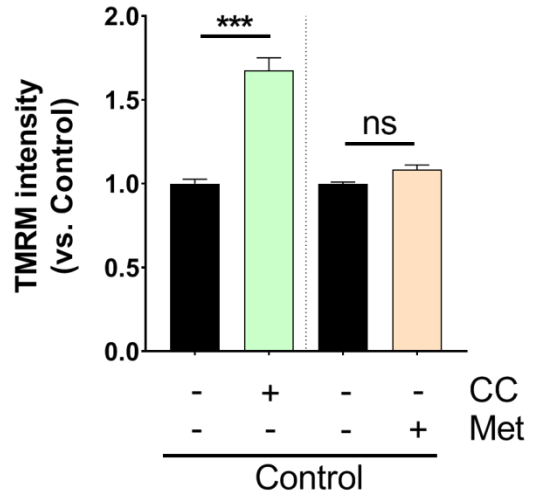
ANTIBODY	SOURCE	IDENTIFIER	DILUTION
Rabbit anti-phospho T172 AMPK α	Cell Signaling Technology	Cat#50081S	1:1000 (WB)
Rabbit anti-AMPK α	Cell Signaling Technology	Cat#2532	1:1000 (WB)
Rabbit anti-phospho S555 ULK1 (D1H4)	Cell Signaling Technology	Cat#5869	1:1000 (WB)
Rabbit anti-ULK1 (D8H5)	Cell Signaling Technology	Cat#8054	1:1000 (WB)
Rabbit anti-phospho S172 TBK1 (D52C2)	Cell Signaling Technology	Cat#5483	1:1000 (WB)
Rabbit anti-TBK1 (S1B4)	Cell Signaling Technology	Cat#3504	1:1000 (WB)
Mouse Monoclonal anti- β -Actin	Sigma-Aldrich	Cat#A5316	1:5000 (WB)
Mouse Monoclonal anti- β -Tubulin	Sigma-Aldrich	Cat#T4026	1:5000 (WB)
Rabbit anti-GFAP	Novus Biologicals	Cat#NB300-141	1:1000 (IHC, IF)
Rabbit anti-Iba1	FUJIFILM Wako Chemicals	Cat#019-19741	1:1000 (IHC, IF)
Mouse Monoclonal anti-Parkin	Millipore	Cat#5512	1:1000 (WB); 1:500 (IF)
Mouse monoclonal anti-pTau (Ser202/Thr205) (AT8)	Thermo Fisher Scientific	Cat#MN1020	1:1000 (IHC)
Mouse 82E1 (1 st free aa of A β and C99)	IBL America	Cat#10323	1:1000 (WB); 1:800 (IF)
Rabbit anti-APP Cter	Gift from P. Fraser (Toronto)		1:1000 (WB)

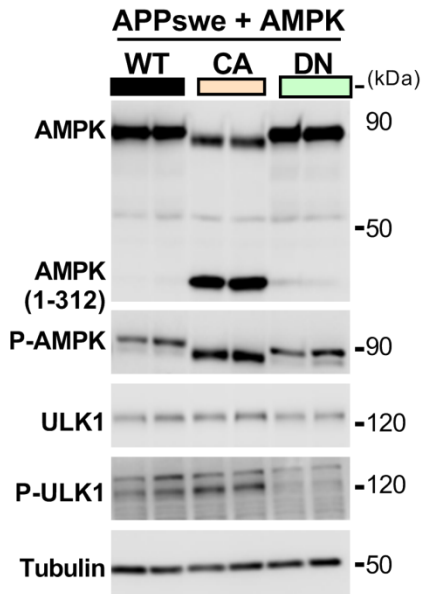
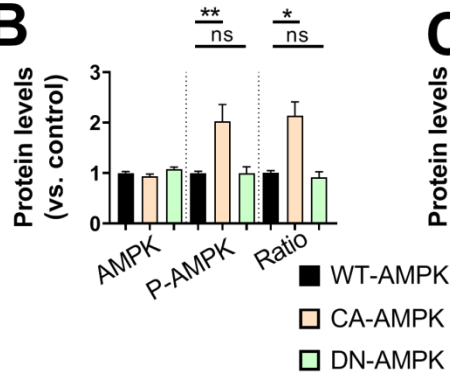
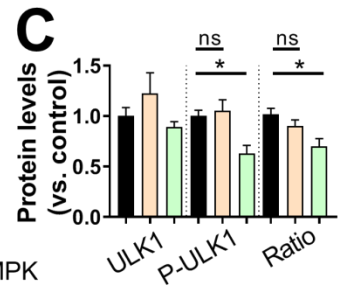
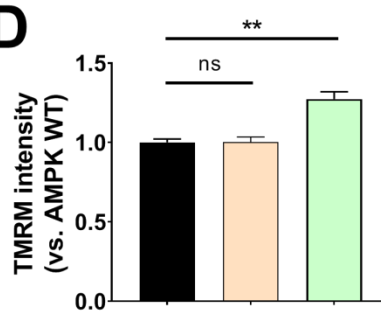
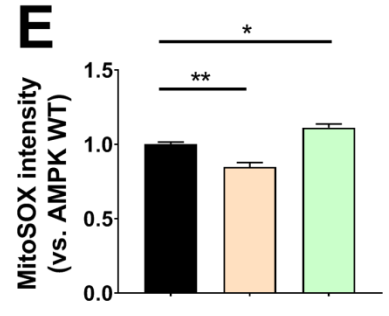
Legends to supplementary figures:

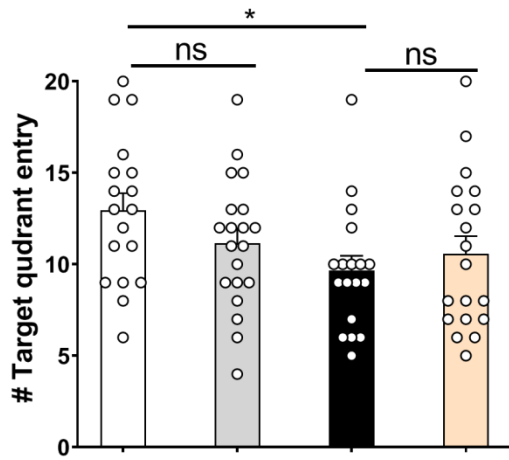
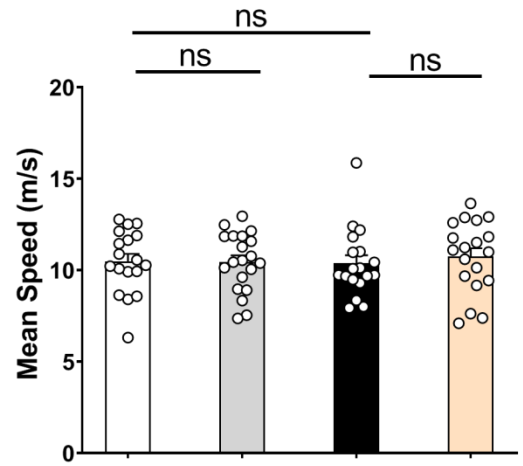
Supplementary Figure 1: AMPK-ULK1 cascade blockade impacts mitochondrial function in control cells. (A, B) Graphs representing MitoSox (A) or TMRM (B) median intensities obtained by FACS analyses in cells expressing empty vector (control) untreated or treated for 6h with vehicle, CC (10 μ M) or Met (2mM). Median fluorescence intensities are expressed as means \pm SEM versus control (taken as 1) obtained from at least 3 independent experiments in triplicates. *** $P < 0.001$, and ns: non-significant using Mann Whitney test.





Supplementary Figure 2: AMPK-ULK1 cascade genetic modulation impacts mitochondrial function in APP^{swe} expressing cells. (A) Representative SDS-PAGE and the quantitative graphs (B, C) showing the overexpression of WT-AMPK, truncated CA-AMPK and DN-AMPK constructs and of p(Thr172)AMPK, p(Ser555)ULK1, and total ULK1, protein levels and the ratio of the phosphorylated forms of AMPK, and ULK1 versus respective total proteins. (D, E) Graphs representing TMRM (D) or MitoSox (E) median intensities obtained by FACS analyses in cells transfected as in (A). Median fluorescence intensities are expressed as means \pm SEM versus control (taken as 1) obtained from at least 3 independent experiments in triplicates. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and ns: non-significant using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test.

Supplementary Figure 3: Metformin failed to restore memory deficit in 3xTgAD mice and did not impact locomotor activity (A, B) number of entries in target quadrant (A) and swimming speeds (m/sec) recorded 24h after the learning test. (A, B)* $P < 0.05$, and ns: non-significant using Kruskal-Wallis test and Dunn's multiple comparisons post-test.

A**B**

A**B****C****D****E**

A**B**

WT	WT	AD	AD
H ₂ O	Met	H ₂ O	Met
			

References

1. Scheltens, P., et al., *Alzheimer's disease*. Lancet, 2016. **388**(10043): p. 505-17.
2. Bloom, G.S., *Amyloid-beta and tau: the trigger and bullet in Alzheimer disease pathogenesis*. JAMA Neurol, 2014. **71**(4): p. 505-8.
3. Zhang, Y.W., et al., *APP processing in Alzheimer's disease*. Mol Brain, 2011. **4**: p. 3.
4. Selkoe, D.J. and J. Hardy, *The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years*. EMBO Mol Med, 2016. **Mar 29**(pii: e201606210).
5. Devi, L. and M. Ohno, *Mitochondrial dysfunction and accumulation of the beta-secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice*. Neurobiol Dis, 2012. **45**(1): p. 417-24.
6. Lauritzen, I., et al., *The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus*. J Neurosci, 2012. **32**(46): p. 16243-1655a.
7. Pulina, M.V., et al., *C99 selectively accumulates in vulnerable neurons in Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement, 2020. **16**(2): p. 273-282.
8. Vaillant-Beuchot, L., et al., *Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains*. Acta Neuropathol, 2021. **141**(1): p. 39-65.
9. Sasaguri, H., et al., *APP mouse models for Alzheimer's disease preclinical studies*. EMBO J, 2017. **36**(17): p. 2473-2487.
10. Johnson, E.C.B., et al., *Behavioral and neural network abnormalities in human APP transgenic mice resemble those of App knock-in mice and are modulated by familial Alzheimer's disease mutations but not by inhibition of BACE1*. Mol Neurodegener, 2020. **15**(1): p. 53.
11. Checler, F., et al., *Is gamma-secretase a beneficial inactivating enzyme of the toxic APP C-terminal fragment C99?* J Biol Chem, 2021. **296**: p. 100489.
12. Lauritzen, I., et al., *Intraneuronal aggregation of the beta-CTF fragment of APP (C99) induces Abeta-independent lysosomal-autophagic pathology*. Acta Neuropathol, 2016. **132**(2): p. 257-76.
13. Mondragon-Rodriguez, S., et al., *Alzheimer's Transgenic Model Is Characterized by Very Early Brain Network Alterations and beta-CTF Fragment Accumulation: Reversal by beta-Secretase Inhibition*. Front Cell Neurosci, 2018. **12**: p. 121.
14. Kaur, G., et al., *Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein*. Mol Psychiatry, 2017. **22**(7): p. 981-989.
15. Bourgeois, A., et al., *Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice*. Neurobiol Aging, 2018. **71**: p. 21-31.
16. Kwart, D., et al., *A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP beta-CTFs, Not Abeta*. Neuron, 2019. **104**(5): p. 1022.
17. Wang, W., et al., *Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer's disease: recent advances*. Molecular Neurodegeneration, 2020. **15**(1): p. 30.
18. Pickles, S., P. Vigie, and R.J. Youle, *Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance*. Curr Biol, 2018. **28**(4): p. R170-R185.
19. Reddy, P.H. and D.M. Oliver, *Amyloid Beta and Phosphorylated Tau-Induced Defective Autophagy and Mitophagy in Alzheimer's Disease*. Cells, 2019. **8**(5).
20. Cummins, N., et al., *Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria*. EMBO J, 2019. **38**(3).

21. Simonovitch, S., et al., *The Effects of APOE4 on Mitochondrial Dynamics and Proteins in vivo*. Journal of Alzheimer's disease: JAD, 2019. **70**(3): p. 861-875.
22. Manczak, M., et al., *Hippocampal mutant APP and amyloid beta-induced cognitive decline, dendritic spine loss, defective autophagy, mitophagy and mitochondrial abnormalities in a mouse model of Alzheimer's disease*. Human Molecular Genetics, 2018. **27**(8): p. 1332-1342.
23. Trefts, E. and R.J. Shaw, *AMPK: restoring metabolic homeostasis over space and time*. Mol Cell, 2021. **81**(18): p. 3677-3690.
24. Joseph, B.K., et al., *Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A^{ppp2r2d}*. J Biol Chem, 2015. **290**(17): p. 10588-98.
25. Herzig, S. and R.J. Shaw, *AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2017.
26. Zhao, P., et al., *TBK1 at the Crossroads of Inflammation and Energy Homeostasis in Adipose Tissue*. Cell, 2018. **172**(4): p. 731-743 e12.
27. Wong, P.M., et al., *The ULK1 complex: sensing nutrient signals for autophagy activation*. Autophagy, 2013. **9**(2): p. 124-37.
28. Matsumoto, G., et al., *TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation*. Hum Mol Genet, 2015. **24**(15): p. 4429-42.
29. Bettcher, B.M., et al., *Peripheral and central immune system crosstalk in Alzheimer disease - a research prospectus*. Nat Rev Neurol, 2021.
30. Onyango, I.G., et al., *Neuroinflammation in Alzheimer's Disease*. Biomedicines, 2021. **9**(5).
31. Kinney, J.W., et al., *Inflammation as a central mechanism in Alzheimer's disease*. Alzheimers Dement (N Y), 2018. **4**: p. 575-590.
32. Peixoto, C.A., et al., *AMPK activation: Role in the signaling pathways of neuroinflammation and neurodegeneration*. Exp Neurol, 2017. **298**(Pt A): p. 31-41.
33. Oddo, S., et al., *Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: intracellular Abeta and synaptic dysfunction*. Neuron, 2003. **39**(3): p. 409-21.
34. Oules, B., et al., *Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease*. J Neurosci, 2012. **32**(34): p. 11820-34.
35. Lacampagne, A., et al., *Post-translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits*. Acta Neuropathol, 2017. **134**(5): p. 749-767.
36. Valverde, A., et al., *Aminopeptidase A contributes to biochemical, anatomical and cognitive defects in Alzheimer's disease (AD) mouse model and is increased at early stage in sporadic AD brain*. Acta Neuropathol, 2021.
37. Bussiere, R., et al., *Upregulation of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 1 Truncated Isoform Plays a Pathogenic Role in Alzheimer's Disease*. Cells, 2019. **8**(12).
38. Mu, J., et al., *A role for AMP-activated protein kinase in contraction- and hypoxia-regulated glucose transport in skeletal muscle*. Mol Cell, 2001. **7**(5): p. 1085-94.
39. Pardossi-Piquard, R., et al., *Influence of Genetic Background on Apathy-Like Behavior in Triple Transgenic AD Mice*. Curr Alzheimer Res, 2016. **13**(8): p. 942-9.
40. Opitz-Araya, X. and A. Barria, *Organotypic hippocampal slice cultures*. J Vis Exp, 2011(48).
41. Wang, L., et al., *Upregulation of AMPK Ameliorates Alzheimer's Disease-Like Tau Pathology and Memory Impairment*. Mol Neurobiol, 2020. **57**(8): p. 3349-3361.

42. Wang, L., et al., *Deletion of Type-2 Cannabinoid Receptor Induces Alzheimer's Disease-Like Tau Pathology and Memory Impairment Through AMPK/GSK3 β Pathway*. Mol Neurobiol, 2018. **55**(6): p. 4731-4744.
43. Lu, X.Y., et al., *Metformin Ameliorates A β Pathology by Insulin-Degrading Enzyme in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease*. Oxid Med Cell Longev, 2020. **2020**: p. 2315106.
44. Ma, T., et al., *Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid β* . J Neurosci, 2014. **34**(36): p. 12230-8.
45. Fang, E.F., et al., *Mitophagy inhibits amyloid-beta and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease*. Nat Neurosci, 2019. **22**(3): p. 401-412.
46. Yamada, E., et al., *Fyn phosphorylates AMPK to inhibit AMPK activity and AMP-dependent activation of autophagy*. Oncotarget, 2016. **7**(46): p. 74612-74629.
47. Onishi, M., et al., *Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy*. EMBO J, 2021. **40**(3): p. e104705.
48. Ou, Z., et al., *Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice*. Brain Behav Immun, 2018. **69**: p. 351-363.
49. Chen, Y., et al., *Metformin attenuates plaque-associated tau pathology and reduces amyloid- β burden in APP/PS1 mice*. Alzheimers Res Ther, 2021. **13**(1): p. 40.
50. Chen, Y., et al., *Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(10): p. 3907-12.
51. Picone, P., et al., *Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF- κ B activation: Use of insulin to attenuate metformin's effect*. Biochim Biophys Acta, 2015. **1853**(5): p. 1046-59.
52. Son, S.M., et al., *Metformin Facilitates Amyloid- β Generation by β - and γ -Secretases via Autophagy Activation*. J Alzheimers Dis, 2016. **51**(4): p. 1197-208.
53. Vingtdeux, V., et al., *AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism*. J Biol Chem, 2010. **285**(12): p. 9100-13.
54. Vingtdeux, V., et al., *AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies*. Acta Neuropathol, 2011. **121**(3): p. 337-49.
55. Kim, B., et al., *Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPK Ser-485 Phosphorylation*. J Biol Chem, 2015. **290**(31): p. 19146-57.
56. Thornton, C., et al., *AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid β -peptide exposure*. Biochem J, 2011. **434**(3): p. 503-12.
57. Domise, M., et al., *AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 26758.
58. Eysert, F., et al., *Molecular Dysfunctions of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) in Alzheimer's Disease*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(24).
59. Chiang, M.C., et al., *Metformin activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction*. Exp Cell Res, 2016. **347**(2): p. 322-31.
60. Pilipenko, V., et al., *Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease*. Eur J Pharmacol, 2020. **881**: p. 173290.

61. Saffari, P.M., et al., *Metformin loaded phosphatidylserine nanoliposomes improve memory deficit and reduce neuroinflammation in streptozotocin-induced Alzheimer's disease model*. Life Sci, 2020. **255**: p. 117861.
62. Labuzek, K., et al., *Metformin increases phagocytosis and acidifies lysosomal/endosomal compartments in AMPK-dependent manner in rat primary microglia*. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2010. **381**(2): p. 171-86.
63. DiTacchio, K.A., S.F. Heinemann, and G. Dziewczapolski, *Metformin treatment alters memory function in a mouse model of Alzheimer's disease*. J Alzheimers Dis, 2015. **44**(1): p. 43-8.
64. Du, L.L., et al., *AMPK activation ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and spatial memory impairment in a streptozotocin-induced Alzheimer's disease model in rats*. J Alzheimers Dis, 2015. **43**(3): p. 775-84.
65. Wang, H., et al., *Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease*. Toxicology Letters, 2018. **282**: p. 100-108.
66. Koenig, A.M., et al., *Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease: Pilot Data From a Randomized Placebo-controlled Crossover Study*. Alzheimer Dis Assoc Disord, 2017. **31**(2): p. 107-113.
67. Campbell, J.M., et al., *Metformin Use Associated with Reduced Risk of Dementia in Patients with Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis*. J Alzheimers Dis, 2018. **65**(4): p. 1225-1236.

Discussion de la partie I

A) Les APP-CTFs s'accumulent au niveau des mitochondries dans la MA

Nous avons démontré la **présence de l'APP et l'accumulation de ses catabolites dans la fraction mitochondriale dans des modèles cellulaires mimant les formes génétiques de la MA ainsi que dans les cerveaux de patients Alzheimer sporadiques**. Nos résultats sont en accord avec de précédentes études rapportant que l'APP est associée aux mitochondries (Anandatheerthavarada and Devi, 2007; Pavlov et al., 2011) et que les catabolites de l'APP ($A\beta$, C99 et AICD) sont présents dans la mitochondrie de modèles cellulaires (Chen and Yan, 2010; Devi and Ohno, 2012) et dans des cerveaux de patients Alzheimer sporadiques ou familiaux (Evin et al., 2003; Pera et al., 2013; Pulina et al., 2020). La localisation de l'APP et de ses catabolites dans la fraction mitochondriale peut être expliquée par la présence de l'APP et de ses catabolites (APP-CTFs et $A\beta$), ainsi qu'une activité β - et γ -sécrétase dans les MAMs (Del Prete et al., 2017; Pera et al., 2017) et par le fait qu'il y a une augmentation des MAMs dans le contexte de la MA (Area-Gomez et al., 2012; Del Prete et al., 2017). Nous avons rapporté que l'accumulation des APP-CTFs est associée à un défaut de la mitophagie. De manière intéressante, le processus mitophagique est régulé par les MAMs (Yang et al., 2020a). En effet, les MAMs sont le lieu où PINK1 et Bcl-1 vont se relocaliser pour promouvoir la formation de phagosomes (Gelmetti et al., 2017). De plus, l'activation de la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante participe au découplage entre le RE et la mitochondrie, nécessaire à la dégradation des mitochondries par mitophagie (McLelland et al., 2018).

B) L'accumulation des APP-CTFs provoque des défauts de structure et de fonctionnement des mitochondries

Nous avons analysé la structure des mitochondries dans nos modèles cellulaires et murins par microscopie électronique et par microscopie par fluorescence en 3D. Les cellules APP^{swe} présentent des **mitochondries gonflées** avec une **désorganisation de la structure des crêtes**. La corrélation de ces altérations avec une modulation de l'expression des protéines de fission et fusion mitochondriale n'est cependant pas évidente. De plus, l'accumulation spécifique des APP-CTFs (C99 et C83) dans ces cellules par **l'inhibition pharmacologique de la γ -sécrétase, aggrave les défauts de structure des crêtes et entraîne une fragmentation des mitochondries**. A contrario, le blocage de l'accumulation du C99 et de l' $A\beta$ par l'inhibition pharmacologique de la β -sécrétase permet d'améliorer ces défauts de structure des crêtes. Ces résultats suggèrent **un impact différentiel de l' $A\beta$ et des APP-CTFs sur l'altération de la structure des mitochondries**. *In vivo*, les souris 3xTgAD présentent une altération de la structure des crêtes à un stade précoce de la maladie (5 mois) en amont du développement des plaques amyloïdes. Ces altérations sont exacerbées suite à l'inhibition de la γ -sécrétase favorisant l'accumulation des APP-CTFs en l'absence de l' $A\beta$. La contribution de l'accumulation du C99 dans les défauts de structure mitochondriale a été aussi analysée dans les souris injectées avec de l'AAV-C99. A un âge précoce (2-3 mois) et plus tardif (12 mois), le C99 est accumulé dans les mitochondries et la structure des crêtes est endommagée, avec en plus un phénotype de gonflement des mitochondries chez les souris âgées. Enfin, les souris 2xTgAD âgées de 17 mois, accumulant les APP-CTFs mais pas l' $A\beta$ et pTau, présentent les mêmes défauts de structure que les 3xTgAD du même âge, ce qui renforce la conclusion que **l'accumulation des APP-CTFs, indépendamment de celle de l' $A\beta$, participe *in vivo***

à l'endommagement de la structure des mitochondries. D'ailleurs, les altérations morphologiques précoces des mitochondries ont été également décrites dans les souris APP/PS1 dès l'âge de 3 mois, avant les dépôts amyloïdes et les problèmes cognitifs se développant à 6-9 mois (Xu et al., 2017).

Du fait de sa localisation mitochondriale, des études ont démontrés que l'A β interagit et perturbe le fonctionnement de différentes protéines mitochondriales (Wilkins and Swerdlow, 2017), causant une réduction de l'OXPPOS (Bobba et al., 2013; Emmerzaal et al., 2018; Kim et al., 2000). En accord avec cette toxicité mitochondriale liée à l'A β , nous rapportons une amélioration des dysfonctions du complexe I et l'activation exacerbée de la caspase-3 par la staurosporine dans les cellules APPswe suite à l'inhibition de la γ - et de la β -sécrétase, indiquant une implication majeure de l'A β dans ces perturbations. Par ailleurs, l'utilisation des cellules exprimant le C99 et des inhibiteurs de la γ - et β -sécrétase nous a permis de déterminer que certaines des altérations de la fonction mitochondriale sont attribuables spécifiquement à l'A β (**baisse du $\Delta\Psi_{mit}$**), aux APP-CTFs (**hausse des ROSmit**) et à la co-accumulation de l'A β et des APP-CTFs (**déficit du complexe I**) (Figure 32). Ainsi, nos résultats supportent l'idée que l'accumulation de l'A β et des APP-CTFs agissent de concert pour affecter les fonctions mitochondriales dans le contexte de la MA.

C) L'accumulation des APP-CTFs provoque un blocage de l'autophagie et de la mitophagie

Comme nous avons vu dans la littérature précédemment, un blocage de la mitophagie est attesté dans les cerveaux ainsi que dans les tissus périphériques des patients avec des formes sporadiques et familiales de la MA. De plus, avec l'apport des études de différents modèles précliniques de la maladie, il est connu que différents acteurs de la maladie (A β , Tau, PS1, APOE4) contribuent à ce blocage de la mitophagie en agissant à différentes étapes du processus. Mais l'impact de l'accumulation des APP-CTFs sur la mitophagie n'était pas documenté. Mon équipe avait néanmoins rapportée *in vivo*, que l'accumulation de C99 dans les membranes des vacuoles des endosomes et lysosomes, cause une **diminution de la dégradation lysoso-autophagique** (Lauritzen et al., 2016). De plus, l'accumulation des APP-CTFs dans les lysosomes dans les souris APP (E693Q) provoque un phénotype de lysosomes gonflés (Kaur et al., 2017) et l'accumulation du C99 dans les fibroblastes de patients avec T21 provoque une alcalinisation, signe d'une capacité de dégradation réduite (Jiang et al., 2019). Ainsi les APP-CTFs, et le C99 en particulier, semblent capables de perturber la digestion lysosomale, qui participe pourtant à la dégradation du C99 (Lauritzen et al., 2016). Ainsi, l'accumulation du C99 est la cause et conséquence de la baisse de la dégradation lysoso-autophagique. Par ailleurs, il a été rapporté que NRBF2, un nouveau membre identifié du complexe PI3K de classe I, voit son expression réduite dans les souris 5xFAD alors qu'il permet de stimuler l'autophagie et la dégradation autophagique des APP-CTFs (Yang et al., 2017).

Concernant la mitophagie dans la MA, mon équipe d'accueil avait déjà démontré que l'**AICD**, issu du clivage des APP-CTFs C83 ou C99 par la γ -sécrétase, est capable de **contrôler la mitophagie** (Goiran et al., 2018). En effet, l'AICD nucléaire peut stimuler la transcription du gène *PINK1*, ce qui augmente les niveaux protéiques de PINK1 et la mitophagie (dégradation de p62, TOMM20 et TIMM23) (Goiran et al., 2018). De plus, cet article rapporte aussi l'existence d'une cascade moléculaire où Parkine, de par son activité de facteur de transcription, stimule la transcription de *PS1* (Duplan et al., 2013), causant une augmentation du clivage de l'APP par la γ -sécrétase, et donc de la production d'AICD, augmentant à son tour la transcription de *PINK1* (Goiran et al., 2018). Notre article rapporte pour la première fois que l'**accumulation des APP-CTFs**, dans des modèles cellulaires et murins de la MA, entraîne un **blocage de la mitophagie** (Figure 32). Nous avons observé une initiation de la mitophagie dans les cellules APPswe, signe que ces cellules sont capables de réagir à l'accumulation des APP-CTFs, de l'A β

et aux dommages mitochondriaux. Cependant, cette mitophagie ne parvient pas à son terme, ce qui peut être notamment dû à une baisse de la formation des mitophagosomes et de leur fusion avec les lysosomes. L'inhibition de la γ -sécrétase, exacerbe cette perturbation, indiquant que le blocage de la mitophagie est attribuable à l'accumulation des APP-CTFs. De plus, la surexpression du C99 provoque un phénotype de blocage de la mitophagie similaire à celui retrouvé dans les cellules APPswe avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase. La différence entre l'activation de PINK1 et Parkine dans les APPswe mais pas dans les APPswe avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase ou dans les cellules C99, peut s'expliquer par le fait que les APPswe ont un $\Delta\Psi_{mit}$ diminué alors que les cellules C99 présentent une hyperpolarisation de leur Ψ_m , défavorable à la stabilisation/activation de PINK1. Nous avons confirmé ces résultats dans différents modèles de souris à différents âges. Le défaut de la mitophagie est déjà détectable dans les jeunes souris 3xTgAD (accumulant les APP-CTFs en l'absence d'un niveau détectable de l'A β) et elle est exacerbée suite à l'inhibition de la γ -sécrétase (bloquant d'avantage la production de l'A β au profit d'une accumulation des APP-CTFs).

Par ailleurs, en comparant les souris 3xTgAD âgées (accumulant à la fois les APP-CTFs, l'A β et présentant les plaques séniles et les DNF) avec les souris 2xTgAD du même âge (accumulant les APP-CTFs en l'absence de l'A β , des plaques séniles et des DNF), nous avons observé que l'accumulation prolongée des APP-CTFs et/ou le développement de la pathologie amyloïde et Tau induisent une activation de la mitophagie qui permet effectivement de dégrader les mitochondries dysfonctionnelles. Il est possible que la sur-activation de la mitophagie puisse également participer à l'accélération du développement de la maladie aux stades tardifs. D'ailleurs, le fragment NH₂hTau, a déjà été démontré comme produisant une sur-dégradation mitophagique délétère (Amadoro et al., 2014). Néanmoins, dans les cerveaux de patients sporadiques, bien qu'il y ait à la fois une accumulation des APP-CTFs, de plaques amyloïdes et de pTau, le phénotype mitophagique se rapproche plus de celui de nos modèles d'accumulation spécifique des APP-CTFs (APPswe, souris C99 et 3xTgAD jeunes avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase). En effet, bien que le ratio LC3-II/I augmente, PINK1 et Parkine sont inhibés et p62 s'accumule. Un point important est que la corrélation entre ces changements et l'augmentation des niveaux de C99 est prépondérante, alors qu'elle n'est que partielle avec l'augmentation des niveaux de l'A β et de pTau.

Nos résultats ont été obtenus dans des modèles cellulaires et murins surexprimant l'APPswe et le C99. Néanmoins, il a également été rapporté que l'expression de C99 à des niveaux endogènes, indépendamment de l'A β , provoque des défauts des systèmes endoso-lysosomiaux et de la clairance des autophagosomes dans des modèles d'iPSC dérivés en neurones exprimant de façon endogène l'APP ou la PSI avec des mutations autosomiques dominantes, ou grâce à des KI de ces mutations (Hung and Livesey, 2018; Kaur et al., 2017; Kwart et al., 2019; Lauritzen et al., 2016). Ces résultats renforcent ainsi nos observations et démontrent l'implication formelle des APP-CTFs dans les dysfonctions autophagiques en général et mitophagiques en particulier.

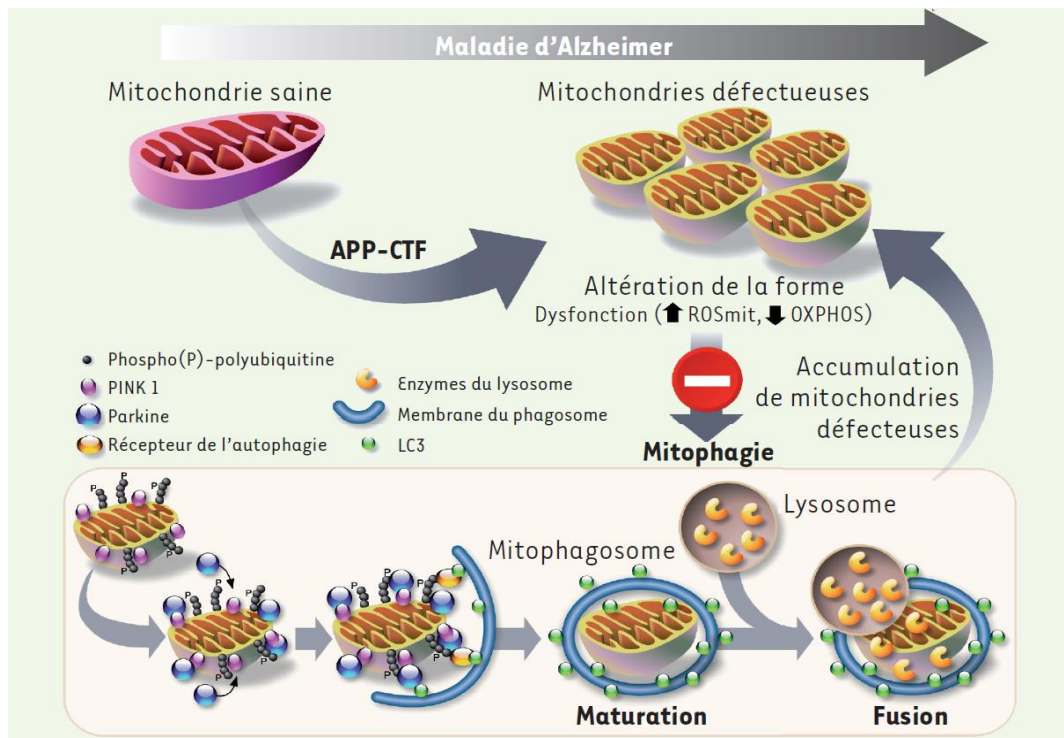


Figure 32 : Schéma récapitulatif de l'impact de l'accumulation des APP-CTFs sur l'homéostasie mitochondriale dans nos modèles d'étude de la MA. (Mary et al., 2021), voir Annexe 1.

D) Cibler l'accumulation des APP-CTFs et les dysfonctions mitochondriales comme stratégie thérapeutique contre la MA

1) Stratégies de modulation de la production des APP-CTFs

Plusieurs études ont conclu que le C99, par lui-même, perturbait le fonctionnement des lysosomes (Jiang et al., 2019; Lauritzen et al., 2016). De plus, des souris surexprimant le fragment C99 (TgC100 ou souris injectée par stéréotaxie avec le C100), présentent une dégénération des neurones et synapses hippocampiques (Oster-Granite et al., 1996), une astrogliose et microgliose, une perturbation de la LTP et des altérations comportementales (Berger-Sweeney et al., 1999; Nalbantoglu et al., 1997). En accord avec ces résultats, mon équipe avait rapporté que l'accumulation de C99, indépendamment de celle de l'A β , dans les souris 3xTgAD et 2xTgAD, est associée à des altérations synaptiques, des déficits d'apprentissage spatial et un comportement apathique (Bourgeois et al., 2018). Nos résultats viennent donc ajouter à cette liste d'effets toxiques l'altération de la structure et du fonctionnement des mitochondries et le blocage de la mitophagie qui peuvent participer au développement et à la progression de la MA. En effet, l'homéostasie mitochondriale est essentielle à la survie des neurones, mais aussi à leur fonctionnement et donc à la plasticité synaptique et aux capacités d'apprentissage et de mémoire (Rossi and Pekkurnaz, 2019). Ainsi, nos résultats renforcent l'idée qu'agir dans le but de réduire l'accumulation des APP-CTFs pourrait être envisagée comme une approche thérapeutique de la MA. Néanmoins, l'inhibition de la γ -sécrétase, dans nos modèles d'étude de la MA *in vitro* ou *in vivo*, provoque une aggravation (ou une absence d'amélioration) des altérations mitochondriales. Ainsi, l'utilisation d'**inhibiteurs de la γ -sécrétase** est à proscrire (Figure 33). D'ailleurs, de tels inhibiteurs ont été testés chez l'humain, mais dans le but de réduire la charge amyloïde. Ces inhibiteurs ont bien réussi à réduire l'A β sécrété détecté dans le LCR et le plasma mais sans amélioration, voire parfois avec des

aggravations, de la cognition possiblement due à une accumulation exacerbée des APP-CTFs (Mitani et al., 2012). De plus, ces inhibiteurs provoquaient parfois des effets secondaires graves dus à l'inhibition concomitante d'autres substrats de la γ -sécrétase, notamment la signalisation de la voie Notch (Checler et al., 2021; Doody et al., 2013). Pour éviter ces problèmes, des **modulateurs de la γ -sécrétase** ont été développés. Ces modulateurs sont capables d'interagir avec l'enzyme et de modifier son activité sans la bloquer, sans affecter la voie Notch, sans augmenter d'avantage les niveaux de C99, et en favorisant la production de formes d'A β moins longues et moins toxiques (Bursavich et al., 2016). Néanmoins, malgré les bénéfices théoriques attendus, les premiers modulateurs de la γ -sécrétase testés (Rofecoxib, Tarenflurbil et Naproxen) ne se sont pas révélés efficaces, et, bien que la raison puisse résider dans leur faible capacité à franchir la BHE, il est à souligner que ces modulateurs ne permettent pas de réduire l'accumulation des APP-CTFs (Checler et al., 2021). A l'inverse, cibler l'activité de la β -sécrétase semble théoriquement réconcilier à la fois l'objectif de baisser la production de toutes les espèces de l'A β et de la production de C99 (et C89 et AICD). Tous les **inhibiteurs de BACE-1** arrivés en essais cliniques de phase 3 ont permis de réduire les niveaux de l'A β dans le cerveau, le LCR et le plasma mais ils ont tous été également stoppés, principalement à cause d'effets secondaires toxiques (Checler et al., 2021). Il a été suggéré que ces effets secondaires pourraient être dus à l'inhibition de l'activité β -sécrétase physiologique envers d'autres substrats que l'APP et/ou à l'inhibition non spécifique d'autres protéases, comme l'hydrolase lysosomale Cat-D, impliquée dans la dégradation mitophagique et la dégradation du C99 (Checler et al., 2021). Enfin, une équipe avait développé en 2012 des « **anticorps anti-C99** », qui étaient en fait soit un anticorps monoclonal dirigé contre les sept premiers résidus du C99 (mC99₁₋₇), soit contre dix résidus C-terminaux (mC99₇₀₋₈₀). Ces anticorps bloquaient le clivage du C99 en A β par la γ -sécrétase, sans affecter la voie Notch (Houacine et al., 2012). Cependant, bien que ces anticorps aient fait baisser l'A β soluble chez des souris APP/PS1, ils provoquaient également et logiquement une accumulation des APP-CTFs (C99 et C83) *in vitro* (Houacine et al., 2012). Bloquer la dégradation du C99 sans, dans le même temps, prévenir son accumulation qui va en résulter promet d'accroître les effets toxiques dus à l'accumulation des APP-CTFs et est donc à proscrire également.

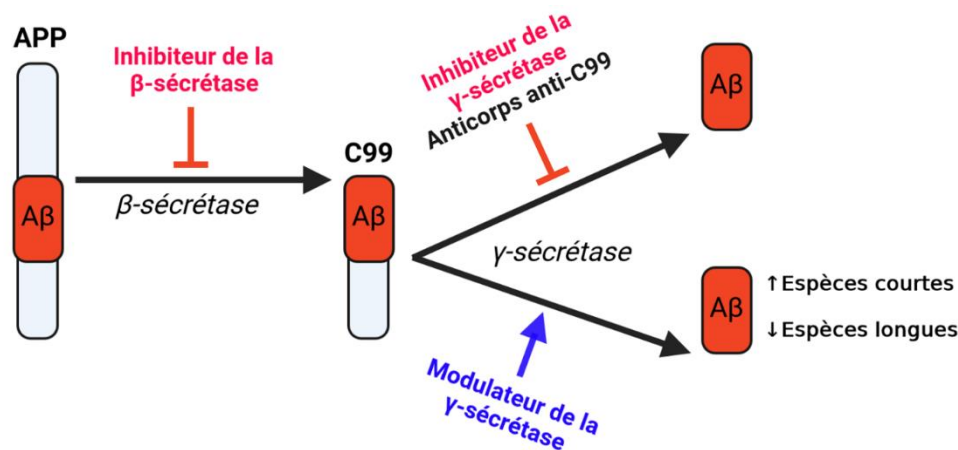


Figure 33 : Stratégies de modulation de la voie amyloïdogène en ciblant les activités des β et γ -sécrétases.

Dans l'idée de réduire la production du C99, il est important de mentionner que plusieurs molécules ont présenté des effets bénéfiques *in vivo* par **stimulation de la voie non-amyloïdogène** de la protéolyse de l'APP, aux dépens de sa dégradation amyloïdogène (Kuang et al., 2017; Wang et al., 2016a; Yan et al., 2017). Plutôt que les sécrétases, l'APP pourrait aussi être directement visé. Ainsi, des anticorps ou des aptamères (des oligonucléotides d'ADN ou d'ARN capables de lier spécifiquement une séquence d'acides aminés) pourraient être élaborés dans l'avenir pour **empêcher l'interaction physique entre**

l'APP et BACE-1 (Checler et al., 2021). Cela bloquerait la production de C99 (et de ses catabolites) sans impacter l'activité physiologique de BACE-1 envers ses autres substrats et sans bloquer ni les rôles physiologiques de l'APP ni sa protéolyse non-amyloïdogène. En amont, **l'expression du gène APP** pourrait aussi constituer une cible. L'édition moléculaire dans la région C-terminale d'APP par CRISPR/Cas9 a été démontrée comme capable de réduire la production de C99 et de l'A $\beta_{40/42}$, et de favoriser la voie non-amyloïdogène produisant du C83 dans des iPSC dérivées en neurones humains et des cerveaux de souris (Sun et al., 2019). **L'épissage des ARNm d'APP** a aussi déjà été ciblé par des splice-switching antisense oligonucleotides, de courts oligonucléotides antisens se liant spécifiquement à l'ARNm d'APP, bloquant les interactions ARN-protéines d'épissages, bloquant l'épissage de l'exon 17 et donc résultant en une protéine APP alternative sans exon 17 (APP Δ ex17) (Chang et al., 2018). Cet exon 17 (V689-V737) a été choisi car il comprend la séquence A β à partir du 18^{ème} résidu et, surtout, les sites de clivages de la γ -sécrétase. Ainsi, l'APP Δ ex17 ne produirait plus l'A β , et l'APP-CTF β alternatif produit sera réduit de 48 résidus correspondant à une partie de la séquence A β , mais surtout de l'entièreté de la portion transmembranaire, suggérant une perte de sa capacité à s'accumuler dans les membranes. Enfin, **la traduction des ARNm d'APP** a aussi été sélectivement inhibée par la molécule Posiphen dans un modèle de souris T21 (Tg65Dn) (Chen et al., 2021a). Cette molécule provoque une diminution des niveaux d'APP mature, de C99 et de C83, et une réduction des altérations du système endoso-lysosomal.

Pour pallier au problème de l'accumulation des APP-CTFs causant des altérations mitochondriales deux solutions pourraient être : 1) plutôt que bloquer la production des APP-CTFs, stimuler leur dégradation, et/ou 2) stimuler la mitophagie pour corriger l'accumulation de mitochondries endommagées.

2) Stratégies de stimulation de la dégradation des APP-CTFs

Mon équipe avait rapporté que dans des modèles murins, le C99 est dégradé dans la voie lysosomale et que son accumulation entraîne une inhibition de cette voie de dégradation (Lauritzen et al., 2016). Ainsi, **stimuler la dégradation lysosomale** pourrait permettre de contrer l'effet de C99 et permettrait de le dégrader, évitant ainsi d'autres effets toxiques liés à l'accumulation du C99 et la génération de l'A β . Etant donné l'importance, évoquée précédemment, du TFEB dans le contrôle de l'autophagie et de la biogenèse des lysosomes, ce facteur de transcription pourrait constituer une cible d'intérêt à stimuler. Dans des modèles murins de la MA, la **surexpression de TFEB** a permis de stimuler les capacités lysosomales et de réduire les niveaux des APP-CTFs (Bécot et al., 2020; Xiao et al., 2015). Encore plus intéressant d'un point de vue thérapeutique, une petite **molécule activatrice de TFEB** traversant la BHE, un analogue de la curcumine, est capable dans différents modèles murins de la MA de stimuler la dégradation lysosomale de l'APP et des APP-CTFs (Song et al., 2020a). L'AMPK étant capable de directement phosphoryler TFEB et ainsi stimuler son activité transcriptionnelle (Paquette et al., 2021), stimuler l'AMPK pourrait permettre, indirectement, de promouvoir l'élimination du C99. Et d'ailleurs, **l'activation de l'AMPK** avec l'AICAR dans des cellules MEF a déjà été démontrée comme capable d'augmenter la translocation nucléaire de TFEB, la transcription de ses cibles (dont la Cathepsine A et D), et d'augmenter le nombre de lysosomes ainsi que l'activité des protéases lysosomales (Paquette et al., 2021). La MET, en plus de pouvoir aussi activer l'AMPK et le TFEB (Lu et al., 2021), est également capable de stimuler la dégradation de l'APP par l'autophagie médiée par les protéines chaperonnes et ainsi réduit les niveaux d'APP et de l'A β_{1-42} dans les souris APP/PS1 (Xu et al., 2021). La **phosphorylation de PS1 sur la Ser367** par la kinase CK1 γ 2 (casein kinase 1 γ 2), stimule la fusion autophagosomes-lysosomes et la dégradation du C99 (Bustos et al., 2017a; Bustos et al., 2017b). Ainsi, l'activation de la phosphorylation de CK1 γ 2 peut constituer une cible favorisant la dégradation du C99. Enfin, une dernière cible pourrait être la protéine sécrétée ILEI (interleukin-like epithelial-mesenchymal transition inducer). En effet, cette dernière est capable de lier PS1 et de bloquer l'activité de chaperonne

de PS1 envers le C99, ce qui rend ILEI capable de provoquer une **déstabilisation du C99** (Hasegawa et al., 2014).

Enfin, le fait que, dans nos modèles de souris 3xTgAD, **l'accumulation des APP-CTFs apparaît précocement**, et même plus tôt que la formation des plaques amyloïdes (Lauritzen et al., 2012), a deux conséquences. La première est que les interventions visant à réduire la production des APP-CTFs, stimuler leur dégradation ou stimuler la mitophagie devrait également avoir lieu précocement pour maximiser leurs effets thérapeutiques. La deuxième conséquence est que des techniques fiables et sensibles de détections des APP-CTFs permettraient d'avoir un **biomarqueur très précoce et spécifique pour le diagnostic de la MA**. D'ailleurs, il a déjà été observé que les APP-CTFs sont détectables dans le LCR de patients (García-Ayllón et al., 2017). De plus, les plaquettes possèdent de l'APP, des activités α - et β -sécrétases, et donc produisent des APP-CTFs de façon similaire aux neurones. D'ailleurs, l'activité β -sécrétase dans les plaquettes augmente chez les patients atteints de MA et même déjà chez les patients MCI (Johnston et al., 2008; Liu et al., 2007). Ainsi, les niveaux des APP-CTFs issus de la voie non-amyloïdogène et amyloïdogène dans les plaquettes des patients pourrait constituer un biomarqueur précoce sanguin de la MA (Evin and Li, 2012).

3) Stratégies de stimulation pharmacologique de la mitophagie

Outre le fait d'agir en faveur d'une réduction de l'accumulation des APP-CTFs, il pourrait être pertinent de **corriger les dysfonctions mitochondriales** engendrées par cette accumulation. Cela est d'autant plus judicieux que l'on a vu que d'autres acteurs de la MA affectent aussi la structure, les fonctions des mitochondries et la dégradation mitophagique. Un bon moyen de restaurer l'homéostasie mitochondriale serait de stimuler la mitophagie afin d'éliminer plus efficacement les mitochondries endommagées. Il se trouve justement que plusieurs types de molécules activatrices de la mitophagie ont déjà été testées dans des études précliniques et parfois chez des patients atteints de la MA, et pourrait donc constituer des molécules candidates pour traiter la MA (*les résultats des essais cliniques sont résumés dans le Tableau 7*).

-L'uroolithine A (UA) est une molécule naturelle de type polyphénol, et plus précisément un ellagitannin, présente dans les grenades, les noix ou les baies. C'est en 2016 que le mécanisme d'action de l'UA et son action d'activateur de la mitophagie *in vitro* et *in vivo* ont clairement été décrits (Ryu et al., 2016). Chez *C. elegans*, l'UA permet d'augmenter l'espérance de vie des vers, un effet partiellement dépendant de l'AMPK et dépendant de l'activation de la mitophagie dans l'intestin et les muscles (Ryu et al., 2016). Dans des cellules de myoblastes (C2C12) et intestinales (Mode-K) murins, la molécule diminue la respiration mitochondriale, en inhibant indirectement l'activité du complexe I, causant une diminution de la quantité d'ATP et l'activation de l'AMPK (*ce qui également l'un des mécanismes d'action de la MET, décrit plus loin*) (Ryu et al., 2016). De plus, le $\Delta\Psi_{mit}$ est également diminué par le traitement UA, ce qui permet une activation de la mitophagie, mise en évidence par l'augmentation des niveaux de PINK1, de l'ubiquitination des mitochondries, une augmentation du ratio LC3-II/I, le recrutement de p62 à la mitochondrie, une augmentation du nombre de mitolysosomes et enfin une baisse du ratio ADNmit/ADNng (Ryu et al., 2016). *In vivo*, chez des souris de 16 mois avec un régime riche en graisses, traités pendant 8 mois avec 50mg/kg/j d'UA, les mêmes variations de l'AMPK, LC3-II/I et p62 sont présentes (Ryu et al., 2016). Dans leur récent article, Fang *et al.* se sont intéressés à l'effet de l'UA dans un contexte neuronal et dans le contexte de la MA (Fang et al., 2019). Dans des cellules SH-SY5Y, l'UA augmente les niveaux de pSer555-ULK1, Bcl-1, PINK1, BCL2L13 et AMBRA1 mais également le nombre de mitophagosomes et mitolysosomes (Fang et al., 2019). Dans des nématodes exprimant l'hA β_{1-42} dans leurs neurones, l'UA permet de réduire les niveaux de l'A β et d'améliorer leur mémoire. Chez les souris APP/PS1, l'UA a permis, via l'activation de la mitophagie, d'inverser les défauts de la structure et de la fonction des mitochondries, et d'augmenter le nombre de synapses. De plus, le

traitement a aussi permis de stimuler la mitophagie et d'atténuer l'accumulation de mitochondries altérées dans les microglies, ce qui a stimulé leur capacité à phagocyter les plaques séniles, et a inversé l'augmentation de la production de cytokines pro-inflammatoires. Enfin, dans les souris 3xTgAD, l'UA a pu réduire l'hyperphosphorylation de Tau et améliorer la mémoire des souris (Fang et al., 2019). Il est à noter que le premier essai clinique (phase 1) sur des patients âgés sains et sédentaires, traités avec 500 ou 1 000mg d'UA pendant 4 semaines (NCT02655393) a conclu que cette molécule est non toxique et est capable de moduler l'expression de gènes mitochondriaux, avec notamment une augmentation des niveaux d'ARNm de PGC1 α mais également de Bcl-1 et Parkine dans les muscles (Andreux et al., 2019).

-Le resvératrol (RSV), ou 3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbène, est également un polyphénol, de la classe des stilbènes, présent dans les raisins, mûres et cacahuètes. Le RSV est connu pour réduire les niveaux de ROSmit et pour induire l'autophagie et la mitophagie (Rege et al., 2014). Le RSV a été étudié dans le contexte de la MA, et a le potentiel d'atténuer la progression de la maladie, via plusieurs mécanismes (Rege et al., 2014). *In vitro*, le RSV est capable de protéger des cellules PC12 de rat de la mort cellulaire, du SO et des dégâts mitochondriaux induits par l'A β ₁₋₄₂, via la stimulation de la mitophagie (Wang et al., 2018a). Il a été rapporté que le RSV exerçait une action neuroprotectrice via l'activation de l'AMPK (Vingtdeux et al., 2010). En effet, *in vitro* le RSV provoque une augmentation des niveaux de [Ca²⁺]_i, à la fois en facilitant l'entrée de Ca²⁺ dans la cellule et en réduisant le stockage de Ca²⁺ par le RE, ce qui va provoquer l'activation de l'AMPK via la CaMKK β . Cette activation de l'AMPK par le RSV permet de réduire les niveaux de l'A β en stimulant sa dégradation lysosomale dans des cultures primaires de neurones issus de souris APP ainsi qu'*in vivo* dans les cerveaux de souris APP/PS1 (Vingtdeux et al., 2010). Dans ce modèle de souris APP/PS1 d'ailleurs, une administration orale de RSV sur le long terme a eu pour conséquence une activation de l'AMPK et SIRT1 (sirtuine 1), qui contrôlent la mitophagie, une réduction de la pathologie amyloïde, et une amélioration des fonctions mitochondriales et de la mémoire (Porquet et al., 2014). Dans un modèle de sénescence accéléré murin (SAMP8), le RSV est également capable d'activer l'AMPK et SIRT1, de réduire la charge en A β et l'hyperphosphorylation de Tau et les problèmes de mémoire (Porquet et al., 2013). Chez l'humain, une étude clinique de phase 2 chez 119 personnes avec un Alzheimer léger à modéré, avec, à la fin des 52 semaines, 1 000mg de RSV deux fois par jour, par voie orale a conclu que le RSV a pu significativement atténuer la diminution des niveaux de l'A β ₁₋₄₀ dans le LCR et le plasma, mais que la diminution du volume cérébrale était plus importante avec le RSV que le placebo (NCT01504854) (Turner et al., 2015). Il est à noter qu'une étude rétrospective est sortie deux ans plus tard dans laquelle les auteurs ont ré-analysé les échantillons de LCR et plasma collectés durant l'essai NCT01504854, mais en n'incluant que les patients avec un « Alzheimer confirmé par biomarqueur », c'est-à-dire avec moins de 600ng/mL d'A β ₁₋₄₂ dans leur LCR en baseline (19 patients traités au RSV et 19 patients placebo) (Moussa et al., 2017). Dans le LCR de ce sous-groupe, le RSV a atténué la réduction de l'A β ₁₋₄₂, diminué les niveaux de l'A β ₁₋₄₀ et de MMP9, et augmenté les niveaux d'IL-4, MDC et FGF-2. Dans le plasma de ce sous-groupe, le RSV abolit l'augmentation de TNF- α , augmente les niveaux de MMP10 et diminue ceux d'IL-12P40, IL12P70 et RANTES/CCL5 (Moussa et al., 2017). Un autre essai a analysé chez 29 patients avec un Alzheimer léger à modéré, l'effet des petites doses de RSV avec 16 patients traités avec un mélange de resvératrol (5mg), glucose (5g) et malate (5g) (RGM), deux fois par jour pendant 1 an (NCT00678431) (Zhu et al., 2018). Avec le traitement RGM, la dégradation des scores de tests neuropsychologiques (ADAS-cog, MMSE, ADAS-ADL et NPI) était moins importante bien que non statistiquement significative (Zhu et al., 2018).

-Le tétrahydroxy stilbène glycoside (TSG) est une molécule naturelle, extraite de l'herbe médicinale chinoise *Polygonum multiflorum*. Elle est connue pour être neuroprotectrice dans le contexte de la MA (Zhang and Chen, 2018). Mais ce n'est que récemment qu'une étude a démontré une connexion entre les effets bénéfiques du TSG et l'activation de l'autophagie et la mitophagie (Gao et al., 2020). Il a été démontré *in vitro*, que le TSG active l'AMPK et sa cible ULK1, ce qui stimule la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante et permet d'atténuer la neuroinflammation et ses dégâts (Gao et al., 2020).

-La β -asarone est également un composé naturel, effecteur principal de l'herbe médicinale *Acorus tatarinowii*. La β -asarone est capable, *in vitro*, de protéger les cellules de la cytotoxicité de l' $A\beta_{1-42}$ via l'activation de l'autophagie et la mitophagie (Wang et al., 2020c). *In vivo*, chez des rats injectés avec de l' $A\beta_{1-42}$, la β -asarone a réussi à stimuler la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante, réduire les niveaux de l' $A\beta_{1-42}$ cérébraux et d'améliorer l'apprentissage et la mémoire de ces animaux (Han et al., 2020b).

-La spermidine est une petite molécule naturelle connue pour pouvoir allonger l'espérance de vie des levures, mouches, nématodes et souris via la stimulation de l'autophagie (Eisenberg et al., 2009; Morselli et al., 2011) et pour être capable de stimuler la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante dans des fibroblastes humains (Qi et al., 2016). Justement, chez des nématodes modèles de la MA, exprimant l'hA β et Tau, la spermidine a pu allonger leur espérance de vie et durée de vie en bonne santé et a pu les protéger contre les pertes de mémoire, le tout grâce à la stimulation de la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante (Yang et al., 2020b). Chez l'humain, un essai clinique chez 28 sujets âgés à risque de développer la MA (patients MCI), a conclu que la spermidine, à raison de 1,2mg par jour sur 3 mois, produit une amélioration de la mémoire dépendante de l'hippocampe (NCT02755246) (Wirth et al., 2018).

-Le tréhalose (THL) est un disaccharide naturel, connu pour induire l'autophagie via TFEB mais indépendamment de mTOR, et est considéré comme un traitement potentiel pour la MA (Khalifeh et al., 2020). *In vivo*, différents modes d'administration du THL ont été neuroprotecteurs dans différents modèles murins de la MA (Khalifeh et al., 2020). Bien que ces effets soient suspectés d'être dus à une induction de l'autophagie en général, une action bénéfique du THL via la stimulation de la mitophagie ne peut pas être écartée. En effet, le THL est capable de protéger les mitochondries du SO par induction d'une mitophagie dépendant de BNIP3 (Tang et al., 2017) et d'atténuer les défauts de structure et de fonctions des mitochondries par l'induction de TFEB et la mitophagie (Zhu et al., 2020).

-L'actinonine (AC) est un agent antibactérien naturel capable d'activer la mitophagie, qui a été testé dans l'article de Fang *et al.* avec des effets analogues à l'UA (Fang et al., 2019). L'AC est en effet capable de prévenir les défauts de mémoire les nématodes modèles de la MA, et dans les souris APP/PS1, capable d'améliorer l'apprentissage et la mémoire, réduire la charge amyloïde ainsi que les défauts de structure et de fonctions des mitochondries et la réduction du nombre de synapses, via la stimulation de la mitophagie. L'AC est aussi capable de réduire les niveaux des APP-CTFs dans ce modèle, de même que stimuler la mitophagie dans les microglies, ce qui augmente leur capacité de clairance des plaques A β et réduit la neuroinflammation (Fang et al., 2019).

-Les précurseurs de NAD⁺ (nicotinamide riboside (NR) et nicotinamide mononucléotide (NMN)) sont de robustes inducteurs de la mitophagie (Aman et al., 2020). Chez le nématode exprimant l'hA β_{1-42} , le NR a permis d'induire la mitophagie, de réduire la charge amyloïde et le stress protéotoxique tout en améliorant la santé et l'espérance de vie des animaux (Sorrentino et al., 2017), tandis que le NMN a augmenté la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante et amélioré leur mémoire (Fang et al., 2019). Chez les souris APP/PS1, le NR a été capable d'augmenter les niveaux de transcrits pour PINK1, LC3 et des protéines de la CRM, tout en réduisant les dépôts amyloïdes et améliorant les capacités cognitives (Sorrentino et al., 2017). Plusieurs essais cliniques sont en cours (NCT04430517, NCT03482167 et NCT03061474) ou vont bientôt publier leur résultats (NCT02942888 et NCT04078178) sur l'effet du NR sur les capacités cérébrales, la cognition, le SO ou les niveaux de pTau dans le LCR dans des patients MCI ou atteints de la MA. Un compte-rendu d'essai, cependant, fait état que des doses élevées de nicotinamide (1 500mg deux fois par jour) pendant 24 semaines chez des patients avec un Alzheimer léger à modéré, étaient relativement sûres mais ne parvenaient pas à améliorer leurs fonctions cognitives, bien que la taille de l'échantillon fût faible (15 patients traités et 16 patients placebo) et que le traitement peut être considéré comme de courte durée (Phelan et al., 2017).

-Le bexarotène est une molécule synthétique, un analogue structurel de l'acide rétinoïque et utilisé contre certains cancers. Le bexarotène est capable d'augmenter la clairance physiologique de l'A β de

réduire les dommages cognitifs des souris APP/PS1 (Cramer et al., 2012), ainsi que d'être capable de réduire les niveaux de Tau et pTau dans le LCR et améliorer la mémoire d'un patient Alzheimer (hétérozygote APOE ϵ 4) (Pierrot et al., 2016). Récemment, il a été démontré que la bexarotène était capable dans les CSN dérivés d'iPSC de patients avec la mutation PS1 (M146L), de stimuler l'autophagie et la mitophagie PINK1/Parkine-dépendante, permettant la dégradation des mitochondries dysfonctionnelles et permettant de préserver la morphologie du réseau mitochondriale (Martín-Maestro et al., 2019). Une autre étude clinique a été menée chez 19 patients atteints d'Alzheimer, parmi lesquels 15 ont été traités avec le bexarotène par voie orale (150mg deux fois par jour au bout des 3 semaines) (Cummings et al., 2016). Les résultats sont cependant assez négatifs, avec le traitement, il y a une réduction des niveaux d'amyloïdes dans 5 régions cérébrales chez les patients non-porteurs de l'allèle APOE ϵ 4 mais associé à une augmentation de la concentration sérique de l'A β ₁₋₄₂ et de triglycérides, le tout sans amélioration des scores des tests neuropsychologiques (Cummings et al., 2016).

-UMI-77 est une petite molécule mimétique de BH3 récemment identifié dans un grand screen d'activateurs de la mitophagie (Cen et al., 2020). UMI-77, via sa cible qu'est le récepteur mitophagique MCL-1, est capable d'induire la mitophagie même en l'absence de dégâts à la mitochondrie, d'apoptose ou d'activation de Parkine *in vitro* et dans les souris APP/PS1 (Cen et al., 2020). Dans ces souris APP/PS1, UMI-77 a été capable d'améliorer la morphologie des mitochondries, la neuroinflammation, la pathologie amyloïde et les défauts d'apprentissage et de mémoire (Cen et al., 2020).

-La metformine (MET) est un dérivé de la galéguine, une molécule naturelle de la plante médicinale *Galega officinalis*, déjà largement prescrite en tant qu'anti-hyperglycémique le plus utilisé dans le contexte du DT2. Néanmoins, comme la MET fait montre d'autres effets bénéfiques au-delà du contrôle de la glycémie, cette molécule est actuellement étudiée pour son utilisation potentielle dans d'autres contextes pathologiques comme les cancers, le vieillissement, les maladies cardiovasculaires ou la MA (Maniar et al., 2017). En effet, la MET est capable de stimuler la mitophagie via l'activation de l'AMPK, *in vivo* et chez l'humain (Bhansali et al., 2020) (*pour plus de détails sur les effets de la MET dans la MA, voir la discussion dédiée à la partie II*). Il a aussi été démontré que l'activation de l'AMPK par la MET était capable de promouvoir la clairance autophagique du pTau présent dans des cellules HT22 en milieu enrichi en glucose et dans l'hippocampe de souris diabétiques, réduisant leurs atteintes cognitives (Chen et al., 2019). Dans des études précliniques pour la MA, il a été démontré que la MET était capable d'agir sur plusieurs phénotypes pathologiques. La Met diminue la phosphorylation de Tau dans des cultures de neurones issus de souris exprimant hTau via l'activation de la phosphatase PP2A (Kickstein et al., 2010). La MET a aussi été rapporté comme pouvant prévenir la formation de plaques amyloïdes et le développement d'atteintes cognitives chez des souris APP/PS1 (Ou et al., 2018). Dans ces souris, la MET a réduit la charge amyloïde, l'inflammation chronique et la mort neuronale dans les hippocampes de ces souris et améliorer leur mémoire spatiale (Ou et al., 2018). Chez l'humain, un essai clinique de 16 semaines avec 20 patients présentant un Alzheimer modéré, avec administration orale de fortes doses de MET (deux fois 1 000mg par jour à la fin des 8 semaines de traitement MET), a conclu que la MET est détectée dans le LCR, et qu'elle a significativement amélioré les fonctions exécutives et présentait une tendance d'amélioration de l'apprentissage, la mémoire et l'attention (NCT01965756) (Koenig et al., 2017). Un essai de phase II/III de prévention de la MA, appelé Metformin in Alzheimer's Dementia Prevention (MAP), avec 370 patients en phase MCI et traités avec, au bout des 2 ans, 2 000mg de MET par jour (ou un placebo), a débuté le 20 avril 2021 (NCT04098666). Des PET-scans seront effectués pour observer la pathologie amyloïde et Tau dans leurs cerveaux, les concentrations plasmatiques de ces deux marqueurs seront aussi analysées, et des tests de comportements seront effectués. Un point à souligner est que la MET est utilisée contre le DT2, considéré un facteur de risque de la MA. Ainsi, il est intéressant de noter qu'une étude ait conclu que le traitement avec la MET seule était associé à une réduction du risque de développer une démence, chez les patients DT2 traités comparé aux patients DT2 non traités (Chin-Hsiao, 2019). De plus, une méta-analyse a conclu que l'incidence de la démence ainsi que celle des troubles cognitifs était significativement réduite chez les patients diabétiques traités avec la MET (Campbell et al., 2018). Tous ces résultats suggèrent non seulement que

la MET est un solide candidat pour être utilisée dans le traitement la MA, mais qu'elle pourrait aussi permettre de prévenir l'apparition de la maladie, au moins dans des populations à risque.

Tableau 7 : Essais cliniques de molécules activatrices de la mitophagie chez des sujets âgés ou MA. Les résultats de ces essais incluent des augmentations (↑), des diminutions (↓), ou des absences de changement (=) de phénotypes, d'événements ou de niveaux d'ARNm ou protéines. IRM : imagerie par résonance magnétique ; IRMf : imagerie par résonance magnétique fonctionnelle ; LCR : liquide céphalorachidien ; PET-scan : tomographie par émission de positron ; ADAS-Cog : Alzheimer's Disease Assessment Scale–cognitive subscale ; MMSE : Mini–Mental State Examination ; ADCS-ADL : Alzheimer's Disease Cooperative Study–Activities of Daily Living Scale ; CDR : Clinical Dementia Rating Scale ; CIBIC-Plus : Clinician's Interview-Based Impression of Change Plus Caregiver Input ; CDR-SOB : Clinical Dementia Rating Sum of Boxes ; CBF : cerebral blood flow ; NPI : Neuropsychiatric Inventory ; MST : mnemonic similarity task.

Molécule	Résultats	Essai clinique et référence
Urolithine A (UA)	Le traitement est non toxique et l'UA et ses métabolites sont détectables dans le plasma et le muscle à toutes les doses testées. ↑ ARNm de multiples gènes mitochondriaux dans le muscle, après 28 jours à 500 ou 1 000mg. ↑ PGC1- α , Bcl-1 et Parkine (ARNm) dans le muscle, après 28 jours à 500 ou 1 000mg.	NCT02655393 01/2016 – 12/2016 (Andreux <i>et al.</i> 2019)
Resvératrol (RSV)	Le traitement au RSV, même à haute dose est non toxique et bien toléré. Le traitement au RSV atténue la diminution des niveaux d'A β ₁₋₄₀ dans le LCR. Le traitement au RSV augmente la diminution du volume cérébrale.	NCT01504854 06/2012 - 03/2014 (Turner <i>et al.</i> 2015)
	Dans le LCR, le traitement au RSV : Atténue la diminution de l'A β ₁₋₄₂ ↓ A β ₁₋₄₀ et MMP9 (protéines). ↑ IL-4, MDC et FGF-2 (protéines).	NCT01504854 06/2012 - 03/2014 (Moussa <i>et al.</i> 2017)
	Dans le plasma, le traitement au RSV : Abolit l'augmentation de TNF- α . ↓ MMP10 (protéine). ↑ IL-12P40, IL12P70 et RANTES/CCL5 (protéines).	
	Tendance à l'amélioration des scores aux tests ADAS-cog, MMSE, ADCS-ADL et NPI (non significatif).	NCT00678431 01/2008 - 06/2011 (Zhu <i>et al.</i> 2018)
Spermidine	Amélioration des scores de MST comparé au placebo et entre la baseline et 3 mois de spermidine.	NCT02755246 04/2016 - 09/2016 (Wirth <i>et al.</i> 2018)
Nicotinamide	Le traitement à la nicotinamide est non toxique. Absence d'amélioration des scores aux tests ADAS-cog, MMSE, ADCS-ADL, CIBIC-Plus et CDR.	(Phelan <i>et al.</i> 2017)
Bexarotène	↑ A β (LCR). ↓ Tau et pTau (LCR). ↑ Performance au test de mémoire.	(Pierrot <i>et al.</i> 2016)
	↓ Amyloïde dans 5 régions du cerveaux de patients non-ApoE4 (PET-scan). ↑ A β ₁₋₄₂ (LCR de patients non-APOE4). = Absence d'amélioration des scores aux tests MMSE, ADAS-Cog, CDR-SOB, NPI et ADCS-ADL.	NCT01782742 02/2013 - 06/2014 (Cummings <i>et al.</i> 2016)
Metformine (MET)	Le traitement à la MET est non toxique et bien toléré et la MET est détectable dans le LCR. = Tau, pTau et A β ₁₋₄₂ (LCR). ↑ CBF en orbitofrontal (IRM).	NCT01965756 01/2013 - 05/2015 (Koenig <i>et al.</i> 2017)

Discussion de la partie II

A) Quel est l'état de la signalisation AMPK dans la MA ?

Différents travaux ont rapporté une altération de la cascade de signalisation de l'AMPK au cours du vieillissement et dans le contexte de la MA. Ainsi, les niveaux d'ARNm d'AMPK α_2 et de pThr172-AMPK α_2 baissent dans l'hippocampe des souris WT (C57) entre 3 et 12 mois. Cette baisse est également observée chez des souris 3xTgAD de 12 mois comparées à leurs contrôles (Wang et al., 2020b). Une inhibition de l'AMPK a aussi été observée chez des souris modèles de la MA par non-expression du CB2R (type-2 cannabinoïd receptor) et dans des mâles APP/PS1 de 7 mois (Lu et al., 2020; Wang et al., 2018b). Une autre étude a ainsi révélé plutôt une activation de l'AMPK chez les souris APP/PS1 qui n'est pas associée à une activation de LKB1 (niveaux de pSer428-LKB1) mais plutôt par une inhibition de Akt (niveaux de pSer473-Akt) (Ma et al., 2014). Cette étude a également rapporté une activation de l'AMPK dans des cerveaux de patients au stade de Braak VI. En accord avec cette observation, Fang *et al.* ont également rapporté une activation de l'AMPK dans des cerveaux de patients Alzheimer sporadiques. Néanmoins, ils ont plutôt révélé une inhibition de la cible directe de l'AMPK (ULK1) et indirecte (TBK1) (baisse des niveaux de pSer555-ULK1 et pSer172-TBK1) (Fang et al., 2019). Nos résultats sont en accord avec ces observations et montrent que l'AMPK est activée dans les cerveaux de notre cohorte de patients Alzheimer sporadiques et une absence de l'activation de ces cibles ULK1 et TBK1 en aval, suggérant un blocage de la signalisation AMPK-ULK1. D'ailleurs, nous rapportons un défaut de la signalisation AMPK-ULK1 dans tous nos modèles cellulaires et murins dans la MA. Les souris femelles 3xTgAD de 10-11 mois ont aussi une activation de l'AMPK, accompagnée d'une inhibition d'ULK1, même si TBK1 est activée. Les cellules exprimant C99 présentent aussi une activation d'AMPK, mais une absence d'activation de sa cible ULK1, bien que TBK1 soit aussi activé. Les cellules APP^{swe} enfin, présentent une inhibition à la fois d'AMPK, de ULK1 et de TBK1. Un des mécanismes pouvant expliquer qu'une augmentation des niveaux de pThr172-AMPK α puisse être associée à une activité kinase inhibée (niveaux inchangés de pSer555-ULK1 ou pSer79-ACC par exemple) a été démontré *in vitro*. En effet, suite au traitement avec l'interleukine pro-inflammatoire TNF- α , il y a une augmentation des niveaux de la forme active pThr172-AMPK α et aussi de sa forme phospho-inhibée (pTyr436-AMPK α) opérée par la kinase Fyn associée à une absence de l'activation de ULK1 et du processus autophagique en aval (Yamada et al., 2016).

B) Quels sont les impacts de la modulation de la signalisation AMPK dans la MA ?

1) Impacts de l'inhibition de l'AMPK

Nous rapportons que l'inhibition pharmacologique de l'AMPK par le CC dans les cellules APP^{swe} inhibe comme attendu l'axe AMPK-ULK1, concomitamment avec une augmentation de l'accumulation des APP-CTFs à la fois monomériques et sous leur forme agrégée. Dans ces conditions, les mitochondries présentent un phénotype de fragmentation et des perturbations de leur fonctionnement (une hyperpolarisation et une augmentation de la production de ROSmit). La spécificité de l'inhibition de l'AMPK par le CC peut être critiquée, mais nous avons rapporté que l'expression d'un mutant dominant négatif, AMPK α_2 (K45R) dépourvu de son activité kinase, provoque également une inhibition de l'axe AMPK-ULK1, une hyperpolarisation et une augmentation de la production de ROSmit. La

fragmentation et la dysfonction des mitochondries sont considérées comme des signes d'une activation de la mitophagie. Néanmoins, l'hyperpolarisation mitochondriale est plutôt une condition associée à l'inhibition de l'activation de PINK1/Parkine. En effet, nos résultats démontrent une inhibition de la mitophagie dans les cellules traitées avec le CC caractérisée par une baisse de recrutement de Parkine à la mitochondrie, une accumulation de vacuoles autophagiques et un blocage de la fusion des mitophagosomes avec les lysosomes. Dans les cultures organotypiques des coupes hippocampiques infectées avec des lentivirus exprimant l'APP^{swe}, nous avons également rapporté que le traitement au CC provoque une diminution de la proportion d'épines dendritiques matures et une augmentation de celle des immatures, signe d'une toxicité neuronale accompagnant le déficit de la fonction mitochondriale et la défaillance de la mitophagie.

2) Impacts de la stimulation de l'AMPK

a) Métabolisme de l'APP

A l'inverse, l'activation de l'AMPK avec la MET dans les cellules APP^{swe} a permis une réduction de l'accumulation des APP-CTFs et de la sécrétion de l'A β ₁₋₄₂ (résultats à consolider en augmentant le nombre d'expériences). *In vivo*, le traitement des souris 3xTgAD de 9 mois avec de la MET dans leur eau de boisson pendant un mois a également permis, dans leur hippocampe, une réduction de l'accumulation des APP-CTFs, de l'A β intracellulaire et sécrété, et de la charge amyloïde (taille des plaques amyloïde). Plusieurs articles ont déjà fait état d'une modulation du métabolisme de l'APP via l'activation de l'AMPK par la MET, mais leurs résultats sont contradictoires. En effet, dès 2009, il a été démontré *in vitro* (neurones corticaux primaires et N2a exprimant l'hAPP) que la MET augmentait la génération des espèces A β et C99 intracellulaires et A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ extracellulaires via une augmentation de la transcription et de l'activité de BACE1 (β -sécrétase) (Chen et al., 2009). De plus, les effets d'une augmentation de la pathologie amyloïde sont annulés lors de co-traitements avec de la MET et du CC ou de l'insuline (Chen et al., 2009). Le traitement à la MET (2mg/mL dans l'eau de boisson pendant 3 mois, à partir de 4 mois) chez des souris 3xTgAD conduit aussi à une augmentation des niveaux de BACE1 et de l'A β ₁₋₄₀ et A β ₁₋₄₂ solubles dans le cerveau (Chen et al., 2009). Dans une lignée de neuroblastomes (LAN5), la MET augmente les niveaux d'APP, de PS1 et de l'A β intra et extracellulaire (Picone et al., 2015). Un autre rapport trouve aussi que dans les SH-SY5Y et les souris 5xFAD, la MET promeut le clivage de l'APP par la β - et la γ -sécrétase et la génération de l'A β (Son et al., 2016). Cependant, plusieurs articles contredisent cet impact négatif de la MET sur la pathologie amyloïde, et concluent plutôt favorablement quant à la stimulation de l'AMPK (avec la MET ou le RSV) pour lutter contre la MA. *In vivo*, la MET active l'AMPK et réduit les niveaux de BACE1 et le nombre de plaques A β dans l'hippocampe et le cortex des souris APP/PS1 (Ou et al., 2018). Deux autres articles, utilisant ces souris APP/PS1, ont rapporté que la MET est capable d'activer l'AMPK et l'IDE au niveau cérébral, ce qui réduit les niveaux de l'A β (Lu et al., 2020) et est capable de réduire la charge en plaque amyloïde dans le cortex et l'hippocampe (Chen et al., 2021b). Un mécanisme moléculaire impliqué dans la réduction des niveaux protéiques de BACE1 provoquée par la MET a même été proposé (Hettich et al., 2014). Ainsi, la MET bloque la traduction de BACE1 via un mécanisme moléculaire impliquant un complexe ARNm-protéine contenant la protéine ubiquitine ligase MID1 (midline-1) (Hettich et al., 2014). Outre la MET, l'activation de l'AMPK par le RSV réduit également l'accumulation extracellulaire de l'A β , effet bloqué par l'ajout de CC. Enfin, le traitement oral de souris avec du RSV active l'AMPK cérébrale et réduit les dépôts de l'A β dans le cortex (Vingtdeux et al., 2010). La réduction de la charge en plaque peut être due à une diminution de sa production mais également à une augmentation de sa dégradation autophagique et lysosomale. En effet, nous avons observé une augmentation du nombre de lysosomes dans les neurones hippocampiques des souris 3xTgAD traitées

avec la MET. A l'inverse, le nombre de lysosomes est réduit et celui des vésicules avec du matériel non dégradé (amphisomes et/ou autolysosomes) est augmenté dans les APPswe traitées avec le CC. Il avait d'ailleurs déjà été rapporté que l'activation de l'AMPK par le RSV inhibe mTOR et stimule donc la dégradation autophagique et lysosomale de l'A β (Vingtdeux et al., 2010).

b) Pathologie Tau

Nous avons observé, dans les souris femelles 3xTgAD de 10-11 mois, une réduction du nombre de cellules marquées par l'AT8 (pSer202/pThr205-Tau) évalué par immunohistochimie, bien qu'il n'y ait pas de réduction significative des niveaux de pTau hippocampiques sur d'autres résidus (Ser199, Thr231 et Ser396) évaluée par ELISA. Mettre nos résultats en perspective par rapport au rôle connu de l'AMPK dans la pathologie Tau s'avère difficile car la littérature est contradictoire à ce sujet. Certains rapports ont conclu qu'une activation aberrante de l'AMPK participe à la pathologie Tau de la MA. En effet, dans cette pathologie (et dans d'autres tauopathies), la forme active pThr172-AMPK s'accumule fortement dans les neurones (Vingtdeux et al., 2011). De plus, pThr172-AMPK s'accumule dans le cytosol des neurones en formant des agrégats ressemblants aux DNF, et ce, même dans les cas de tauopathies primaires donc en l'absence de pathologie amyloïde. Le pThr172-AMPK colocalise également avec des formes de pTau pré-fibrillaire et à des stades avancés de la formation de fibrilles. Enfin, l'AMPK est capable de phosphoryler Tau, *in vitro*, sur la Thr231, Ser396/404 et la Ser409. Par la suite, il a été démontré que l'activation de l'AMPK (AICAR ou MET) dans des cultures primaires de neurones augmente la phosphorylation de Tau sur de multiples résidus (Thr231, Ser262/Ser356), ce qui perturbe sa capacité à lier les microtubules (Domise et al., 2016). L'inhibition de l'AMPK par le CC diminue les niveaux de phosphorylation de ces résidus à des niveaux inférieurs à ceux en condition basale, suggérant que l'AMPK contrôle ces phosphorylations en condition basale. Des souris déplétées de la sous-unité AMPK α_2 ont des niveaux de pTau endogènes réduits et la perte d'expression de l' α_2 dans le modèle de tauopathie murin PS19 (TauP301S) atténue la pathologie Tau (Domise et al., 2016). Dans des mouches *Drosophiles* exprimant hTau, l'expression d'une AMPK α_1 constitutivement active conduit aussi à une augmentation de phosphorylation du résidu Ser262 de Tau (Galasso et al., 2017). Dans des cultures primaires de neurones murins, l'A β_{1-42} provoque l'activation des NMDAR, une augmentation de la [Ca $^{2+}$] $_i$ et l'activation de CaMKK β puis de l'AMPK (Thornton et al., 2011). L'AMPK est capable de phosphoryler Tau sur plus de 20 sites, et Tau phosphorylé par l'AMPK présente une diminution de ses capacités à lier les microtubules. Cependant, suite à l'activation de l'AMPK induite par l'A β_{1-42} , ce sont les résidus Ser396/404 qui ont été rapportées comme étant phosphorylées (Thornton et al., 2011). L'AMPK participerait donc à la pathologie Tau en réponse à l'accumulation de peptide amyloïde. Cependant, plusieurs articles contredisent cet impact négatif de l'AMPK sur la pathologie Tau. *In vitro*, le traitement des lignées de cellules souches corticales humaines différenciées (HK-5320) avec l'AICAR provoque la phospho-activation de l'AMPK sur ses résidus Thr172 et Ser485, et une déphosphorylation de Tau sur la Thr231, Ser199/202, et Ser396 (Kim et al., 2015). Le prétraitement de ces cellules avec de l'insuline, mimant un facteur de risque de la MA, provoque la phosphorylation de la Ser485 mais pas de la Thr172 de l'AMPK et bloque la déphosphorylation de Tau après activation de l'AMPK. L'insuline provoque également une sur-activation d'Akt qui va hyperphosphoryler l'AMPK en Ser485, ce qui inhibe son action de déphosphorylation de Tau. De plus, l'expression d'AMPK α_1 (S485A) non-phosphorylable bloque l'accumulation de pTau causée par l'insuline et permet de nouveau à l'AICAR de réduire les niveaux de pTau (Kim et al., 2015). De façon similaire, le traitement à la MET (4mg/mL pendant 2 mois) des souris APP/PS1 de 9 mois injectées (au niveau de l'hippocampe) avec des extraits de cerveaux de souris PS19 contenant des agrégats de Tau aboutit à une réduction des pTau (Chen et al., 2021b). Le traitement a permis de réduire la quantité de pTau (Ser202/Thr205, Thr231 et Ser422) dans les neurites dystrophiques entourant les plaques A β , en

augmentant la phagocytose de pTau par les microglies et permis de stimuler l'activité autophagique de ces cellules (baisse des niveaux de p62) (Chen et al., 2021b).

a) Structure et fonctions des mitochondries

Nous avons observé dans les APPswe traitées avec la MET, une augmentation du nombre de mitochondries, ce qui semble cohérent avec l'action de l'AMPK sur la biogenèse mitochondriale. La baisse légère de l'aire moyenne des mitochondries est également en accord avec l'action de l'AMPK sur la fission mitochondriale. Ainsi, l'activation de l'AMPK semble permettre une amélioration du phénotype de gonflement des mitochondries de ce modèle (Vaillant-Beuchot et al., 2020). Fonctionnellement, la MET permet de corriger à la fois la dépolarisation et l'excès de production de ROSmit des APPswe. De plus, l'expression d'une sous-unité d'AMPK α_2 constitutivement active permet également de réduire la production de ROSmit. Plus intéressant encore, dans les 3xTgAD, la MET a corrigé plusieurs aspects de la structure des mitochondries. Encore une fois, en accord avec son action sur la biogenèse et la fission mitochondriale, l'activation de l'AMPK a corrigé la réduction du nombre de mitochondries et l'augmentation de leur taille *in vivo*, ainsi que l'organisation des crêtes. En accord avec nos observations, une amélioration de la morphologie des mitochondries endommagée par l'A β_{1-42} par la MET avait également été observée dans des cellules souches neurales humaines (Chiang et al., 2016).

b) Réponse inflammatoire centrale et périphérique

Enfin, la charge en plaque amyloïdes pourrait aussi être réduite par la MET par une stimulation de sa clairance par les microgliales. En effet, nous avons observé une augmentation du recrutement des microglies autour des plaques amyloïdes au niveau du subiculum des souris 3xTgAD traitées avec la MET. D'ailleurs, l'action de la MET sur la neuroinflammation dans l'hippocampe des souris 3xTgAD est bénéfique car elle permet une réduction de la microgliose et de l'astrogliose. De plus, comme la MET est administrée de manière périphérique, nous avons aussi constaté un effet anti-inflammatoire périphérique avec une baisse de la circulation sérique de certaines cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IFN- γ , IL1- β et IL-6). Une réponse anti-inflammatoire et une stimulation des capacités de la clairance des microglies associées à un traitement avec la MET ont déjà été observées dans l'hippocampe d'un modèle de la MA sporadique de rat induit par une injection ICV de la streptozotocine (STZ) (Pilipenko et al., 2020). Un autre article a utilisé ce modèle de rats-STZ injectés en intrapéritonéale (IP) par des nanoliposomes de phosphatidylsérine (PSL) contenant de la MET dans le but d'augmenter le franchissement de la BHE et donc d'améliorer l'adressage cérébral du traitement (Saffari et al., 2020). Avec la MET-PSL, les rats-STZ présentaient, une réduction des niveaux de cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , TNF- α et TGF- α) et du nombre de cellules gliales dans leurs hippocampes. Dans des microglies primaires de rat, la MET active l'AMPK et augmente les capacités phagocytiques des microglies en présence ou non de peptides A β (A β_{1-40} , A β_{1-42} et A β_{25-35}). La MET augmente aussi l'acidification des compartiments lysosomaux/endosomaux en présence ou non de l'A β_{1-40} dans des microglies au repos ou activées (Labuzek et al., 2010). La MET réduit l'activation de NF κ B p65 et la neuroinflammation chronique dans l'hippocampe des souris APP/PS1 (Ou et al., 2018).

c) Pathologie synaptique et cognition

Enfin, d'un point de vue synaptique, la MET a permis de réduire la proportion d'épines immatures dans les coupes organotypiques d'hippocampiques exprimant l'APP^{swe}. De plus, nous avons observé par deux tests comportementaux (piscine de Morris et Barne's Maze) que la MET permet une amélioration des capacités d'apprentissage spatial. Ces résultats sont en accord avec l'effet d'un traitement à des doses similaires (MET à 2mg/mL dans l'eau de boisson pendant 8 mois) dans les souris femelles APP^{swe}/Ind (DiTacchio et al., 2015). Dans nos souris 3xTgAD femelles, seul l'apprentissage et non la mémorisation a pu être amélioré après un mois de MET à 2mg/mL. Ce résultat peut être potentiellement justifié par la courte durée de traitement. L'injection en IP de 200mg/kg de MET durant deux semaines chez des souris APP/PS1 femelles de 26 semaines a aussi amélioré leurs aptitudes à la piscine de Morris (Ou et al., 2018). De plus, chez les rats-STZ, des injections de MET ou de MET-PSL a permis une amélioration de l'apprentissage et la mémoire dans le test de la piscine de Morris (Pilipenko et al., 2020; Saffari et al., 2020). La stimulation de l'AMPK par la MET chez des souris db/db (200mg/kg/jour pendant 8 semaines à partir de 12 semaines), a été capable de diminuer la phosphorylation de Tau et d'améliorer les capacités cognitives des souris (Chen et al., 2019). De plus, l'activation de l'AMPK par l'AICAR et/ou le RSV permet aussi d'atténuer les défauts de mémoire spatiale dans des rats-STZ et un modèle de souris MA par non-expression du CB2R (Du et al., 2015; Wang et al., 2018b). Enfin, chez des souris-STZ, la surexpression d'AMPK permet également de réduire les phosphorylations des Thr231 et Ser396 de Tau et les déficits de mémoire (Wang et al., 2020b).

C) Le ciblage de la signalisation AMPK comme stratégie thérapeutique contre la MA

L'examen des résultats obtenus avec la stimulation ou de l'inhibition génétique ou pharmacologique de l'AMPK dans la MA ne permet pas de dégager une conclusion claire et sans contradiction qu'aurait la stimulation de l'AMPK. Cela nous pousse donc à la prudence quant à son utilisation contre cette pathologie. Ainsi, il semble trop simpliste de conclure que la stimulation de l'AMPK serait forcément bénéfique pour tous les aspects de la cellule. La question du contexte dans lequel la modulation de l'AMPK est effectuée est importante. En effet, dans le contexte de la MA, la stimulation de la MET a fait preuve d'effets bénéfiques dans notre étude et dans d'autres sur les dysfonctions des mitochondries, la pathologie amyloïde et Tau dans les neurones et contre l'activation des astrocytes et des microglies. De nombreuses études ont également conclu que la MET avait un effet protecteur contre le développement et la progression de plusieurs types de cancers (Cwynar-Zajac, 2021). D'ailleurs, une méta-analyse a conclu à une réduction de l'incidence des cancers chez les patients DT2 traités avec la MET (Mekuria et al., 2019). De plus, chez les patients DT2 avec des cancers, la MET améliore aussi la réponse aux radiothérapies et la survie des patients cancéreux (Rao et al., 2018).

Se pose aussi la question de savoir s'il est possible d'améliorer les effets attendus de la MET dans le contexte de la MA : 1) Peut-on cibler des cellules qui présentent un défaut de la signalisation AMPK ? 2) Peut-on améliorer la biodisponibilité et l'efficacité de la MET dans le cerveau ? 3) Est-il possible de déterminer la fenêtre thérapeutique de la MET la plus adaptée chez les malades Alzheimer ?

1) Peut-on cibler les cellules défaillantes ?

A l'instar des cellules cancéreuses déficientes en AMPK suite à une perte de fonction de LKB1, qui deviennent hypersensibles à l'action de la MET, on pourrait imaginer que même administrée de façon systémique, la stimulation de la signalisation AMPK ait une action bénéfique spécifiquement dans les

neurones présentant des défauts de cette dernière. Cela implique néanmoins que les neurones non affectés par la MA, pourraient également avoir leur AMPK stimulé, voir même sur-stimulé. Il serait donc important de déterminer dans un contexte de neurones sains, si la stimulation de l'AMPK est inoffensive ou bien si elle résulte en une perturbation des équilibres cellulaires. Un résultat intéressant est celui montrant que la prise de MET sur de longues durées par les patients avec un DT2, n'entraînait pas d'aggravation de la cognition, mais au contraire, une réduction des troubles cognitifs et des démences (Campbell et al., 2018). Néanmoins, cette amélioration était observée par rapport aux patients DT2 sans le traitement MET, or, les patients DT2, comparés à la population générale, ont plus de risques de développer la MA. Ainsi, il reste à démontrer que la prise de MET sur le long terme n'est pas néfaste chez des sujets sains. Cela va être l'objectif de l'essai clinique TAME (Targeting Aging with Metformin) qui va être mené sur 6 ans sur 3 000 sujets sains, outre le fait qu'ils auront entre 65 à 80 ans, avec l'analyse de l'apparition des maladies comme les maladies cardio-vasculaires, les cancers et les démences (Mohammed et al., 2021).

2) Peut-on améliorer la biodisponibilité et l'efficacité de la MET ?

Une formulation de la MET encapsulée dans des nanoliposomes de phosphatidylsérine (MET-PSL) dans le but d'augmenter le franchissement de la BHE et donc d'améliorer son adressage cérébral a déjà été rapportée comme bénéfique dans un modèle *in vivo* de la MA (Saffari et al., 2020). Cela est d'autant plus intéressant que le prétraitement des microglies primaires de rats avec des nanoliposomes de phosphatidylsérine et de phosphatidylcholine-MET inhibent la production de TNF α , NO et de O $_2^{\cdot-}$ induite par l'A β /IFN- γ (Hashioka et al., 2007). Le repositionnement de la MET pour traiter les cancers a soulevé le problème que l'effet antitumoral de la MET requiert des concentrations sériques bien plus élevées que celles administrées aux patients diabétiques. Ainsi, dans le but d'augmenter la biodisponibilité et l'effet anticancéreux de la MET, il a été développé une MET modifiée par ajout d'un groupement lipophile positif triphénylphosphonium, pour être artificiellement fortement adressée à la mitochondrie (mito-MET) (Kalyanaraman et al., 2017). Cette mito-MET est 1 000 fois plus efficace que la MET pour inhiber le complexe I et activer l'AMPK (Kalyanaraman et al., 2017). Ainsi, concernant l'utilisation de la MET contre la MA, il pourrait être intéressant de l'administrer dans des nanoliposomes pour améliorer son accès au CNS et pourquoi pas encapsuler dans ces nanoliposomes la mito-MET plutôt que la MET, pour améliorer sa biodisponibilité et sa spécificité. En effet, à l'instar des cellules cancéreuses humaines, il se pourrait que l'action de la MET dans le CNS des patients nécessite aussi des concentrations élevées, plus élevées que celles administrées aux patients DT2.

3) Quelle pourrait être la fenêtre d'intervention thérapeutique de la MET ?

On peut également anticiper, comme pour les stratégies contre l'accumulation des APP-CTFs, qu'étant donné la précocité des dysfonctions mitochondriales, que la stimulation de l'AMPK serait plus efficace à des stades précoces de la MA. Cette stimulation permettrait de contrecarrer précocement les perturbations mitochondriales, ainsi que l'accumulation des APP-CTFs. Ainsi, il va être très intéressant de connaître les résultats de l'essai Metformin in Alzheimer's Dementia Prevention qui va tester l'effet de la MET chez des patients en phase MCI, donc avant la phase de démence due à la MA. Si on considère les patients en phase préclinique comme des patients à risques de développer la MA, alors il serait également intéressant de tester les effets de la MET à prévenir l'apparition des premiers symptômes cliniques. Ces effets préventifs de la MET ont déjà été démontrés dans une population avec le facteur de risque DT2, dans laquelle l'incidence de la démence ainsi que celle des troubles cognitifs était significativement diminuée par le traitement avec la MET (Campbell et al., 2018). Pour aller plus loin,

et en prenant en compte l'impact bénéfique de la MET sur la santé cardiovasculaire, les cancers et l'inflammation due à l'âge, un traitement avec la MET pourrait être proposée à des sujets sains comme traitement préventif primaire (avant l'apparition de la maladie), à la manière par exemple de l'aspirine contre les maladies cardiovasculaires, dans le but de prévenir l'apparition de plusieurs pathologie fréquentes avec l'âge, comme la MA. Ceci est exactement la logique du futur essai clinique TAME (Targeting Aging with Metformin).

Conclusions et perspectives générales

En conclusion, dans mon premier article, j'ai démontré que l'accumulation précoce des APP-CTFs, notamment au niveau des mitochondries, provoque des altérations de la structure et des fonctions des mitochondries, ainsi qu'un blocage de la mitophagie.

Dans mon deuxième article, j'ai rapporté une perturbation de la signalisation AMPK-ULK1 dans le contexte de la MA. J'ai démontré que l'inhibition de l'AMPK exacerbe l'accumulation des APP-CTFs, provoque une fission mitochondriale, des dysfonctions mitochondriales, un blocage de la mitophagie et augmente la proportion d'épines dendritiques immatures. La stimulation de l'AMPK réduit l'accumulation des APP-CTFs, améliore la structure et les fonctions mitochondriales, la maturation des épines dendritiques, et réduit les pathologies amyloïde et Tau, l'inflammation et les défauts d'apprentissage.

Ces résultats soulèvent plusieurs questions :

A) Quels sont les mécanismes moléculaires des dysfonctions dues à l'accumulation des APP-CTFs ?

Malgré l'existence de plusieurs articles rapportant différentes dysfonctions associées à l'accumulation des APP-CTFs, ces résultats restent principalement descriptifs, car les mécanismes moléculaires sous-jacents à ces dysfonctions ne sont pas encore bien décrits.

Il serait ainsi intéressant d'analyser avec quelles protéines interagit le C99, et dans quel compartiment, pour essayer d'identifier les cibles moléculaires du C99. Quelques études se sont déjà intéressées à cette question et ont rapporté que le C99 (et C89) interagit dans les endosomes avec TMEM30A (Transmembrane Protein 30A) pour causer des défauts de trafic et de maturation des endosomes (Takasugi et al., 2018), et interagit au niveau des sites présynaptiques avec Syt7 (synaptotagmin-7), causant la diminution de l'expression de cette protéine impliquée dans la plasticité synaptique à court-terme et le réapprovisionnement en vésicule synaptiques (Barthet et al., 2018). Cependant, l'interactome détaillé du C99, ainsi que la validation de ses interacteurs reste à élucider. Un interacteur du C99 un peu spécial déjà décrit est le C99 lui-même (Perrin et al., 2020). Le C99 peut former des dimères, et mon équipe a observé un enrichissement en oligomères formés de C99 et/ou de C83 dans les vésicules extracellulaires (VE) de modèles cellulaires et murins de la MA (Lauritzen et al., 2019). Il a par la suite été démontré que ces VE étaient aussi des sites de production des APP-CTFs, de l'AICD et de l'A β *in vivo* (Pérez-González et al., 2020). Ainsi, il serait intéressant d'étudier la toxicité de ces oligomères de C99 et si les VE sont capables de propager de neurones en neurones (ou dans d'autres types cellulaires) des quantités importantes d'APP-CTFs et d'oligomères d'APP-CTFs et ainsi propager les dysfonctions qu'ils causent.

B) Quels sont les impacts des différents APP-CTFs ?

Outre le C99, d'autres APP-CTFs sont présents et s'accumulent dans la MA, mais très peu, voir rien n'est décrit quant à leur rôles toxiques ou bénéfiques dans la MA. Ainsi, il serait très important de mieux comprendre les impacts spécifiques des fragments C83, AICD, et d'autres fragments issus du clivage par la β -sécrétase (C89), ou des APP-CTFs produits par les voies de clivages non-canoniques (CTF η , CTF δ , C31 et Jcasp).

C) Validation des approches pharmacologiques de modulation de l'AMPK

Dans notre article, nous avons utilisé des molécules pour inhiber (CC) ou stimuler (MET) l'AMPK *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Par des approches génétiques d'infections lentivirales permettant l'expression d'AMPK dominant négatif ou constitutivement actif, nous avons confirmé *in vitro* l'implication de l'activité de l'AMPK sur la polarisation mitochondriale et la production de ROSmit. Cette approche génétique pourrait ainsi être utilisée pour valider *in vivo* nos autres observations obtenues avec les molécules.

D) Optimisation du traitement *in vivo* avec la MET

Certains paramètres n'ont pas été améliorés par la MET dans nos souris 3xTgAD. C'est le cas de la mitophagie et de la mémoire. Cela peut être dû à un traitement insuffisamment long et/ou avec des doses insuffisamment importantes pour corriger ces défauts. Pour ce qui est des niveaux des différentes phosphorylations de Tau non réduits après notre traitement MET, cela peut être dû à l'âge des souris à la fin du traitement (10-11 mois), qui correspond seulement au tout début de la pathologie Tau. Ainsi, analyser l'état de phosphorylation de Tau suite à des traitements plus long chez des souris symptomatiques permettra de conclure plus sereinement sur ce paramètre. De plus, en fixant une date de début de traitement précoce, avant le développement des pathologies amyloïde et Tau, le potentiel préventif de la MET pourra également être évalué.

E) Compréhension des mécanismes d'actions de la MET dans un cerveau de malade Alzheimer

Plusieurs études rapportent que la MET possède d'autres effets que la stimulation de l'AMPK et que l'AMPK a différents rôles en fonction des tissus et du contexte. Ainsi, il y a un vrai besoin de clarifier les effets de la MET dans le cerveau (voir même pour chaque type cellulaire du CNS) dans le contexte de la MA. Ces informations pourraient être notamment obtenues par des analyses protéomiques (et phosphoprotéomiques), lipidomiques ou transcriptomiques qui permettent d'évaluer des changements globaux des quantités de protéines (et protéines phosphorylées), lipides et d'ARNm sans présupposer d'une voie spécifiquement altérée. Pour ce qui est de la signalisation AMPK dans la MA, ainsi qu'après stimulation par le traitement avec la MET, il serait instructif d'analyser, au-delà des niveaux de pThr172-AMPK α , pSer555-ULK1 et pSer172-TBK1, l'état d'activation d'autres membres de la cascade, en amont et en aval de l'AMPK.

Références bibliographiques

- Abramov, A.Y., Canevari, L. and Duchen, M.R., 2003. Changes in intracellular calcium and glutathione in astrocytes as the primary mechanism of amyloid neurotoxicity. *J Neurosci*, 23(12): 5088-95.
- Adav, S.S., Park, J.E. and Sze, S.K., 2019. Quantitative profiling brain proteomes revealed mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Molecular brain*, 12(1): 8.
- Ahmadian, M. et al., 2011. Desnutrin/ATGL is regulated by AMPK and is required for a brown adipose phenotype. *Cell Metab*, 13(6): 739-48.
- Altmann, A., Tian, L., Henderson, V.W. and Greicius, M.D., 2014. Sex modifies the APOE-related risk of developing Alzheimer disease. *Annals of neurology*, 75(4): 563-73.
- Alves da Costa, C. et al., 2006. Presenilin-dependent gamma-secretase-mediated control of p53-associated cell death in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 26(23): 6377-85.
- Amadoro, G. et al., 2012. Interaction between NH₂-tau fragment and A β in Alzheimer's disease mitochondria contributes to the synaptic deterioration. *Neurobiol Aging*, 33(4): 833.e1-25.
- Amadoro, G. et al., 2014. AD-linked, toxic NH₂ human tau affects the quality control of mitochondria in neurons. *Neurobiology of Disease*, 62: 489-507.
- Amadoro, G. et al., 2010. A NH₂ tau fragment targets neuronal mitochondria at AD synapses: possible implications for neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 21(2): 445-70.
- Aman, Y. et al., 2020. The NAD(+)-mitophagy axis in healthy longevity and in artificial intelligence-based clinical applications. *Mechanisms of ageing and development*, 185: 111194.
- Anandatheerthavarada, H.K. and Devi, L., 2007. Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *The Neuroscientist : a review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 13(6): 626-38.
- Andreux, P.A. et al., 2019. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab*, 1(6): 595-603.
- Andrzejewski, S., Gravel, S.P., Pollak, M. and St-Pierre, J., 2014. Metformin directly acts on mitochondria to alter cellular bioenergetics. *Cancer & metabolism*, 2: 12.
- Arboleda-Velasquez, J.F. et al., 2019. Resistance to autosomal dominant Alzheimer's disease in an APOE3 Christchurch homozygote: a case report. *Nat Med*, 25(11): 1680-1683.
- Area-Gomez, E. et al., 2009. Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *The American journal of pathology*, 175(5): 1810-6.
- Area-Gomez, E. et al., 2012. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J*, 31(21): 4106-23.
- Asai, M. et al., 2011. An alternative metabolic pathway of amyloid precursor protein C-terminal fragments via cathepsin B in a human neuroglioma model. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(10): 3720-30.
- Baldeiras, I. et al., 2008. Peripheral oxidative damage in mild cognitive impairment and mild Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 15(1): 117-28.
- Barbier, P. et al., 2019. Role of Tau as a Microtubule-Associated Protein: Structural and Functional Aspects. *Front Aging Neurosci*, 11: 204.
- Barger, S.W. and Harmon, A.D., 1997. Microglial activation by Alzheimer amyloid precursor protein and modulation by apolipoprotein E. *Nature*, 388(6645): 878-81.
- Barthet, G. et al., 2018. Presenilin-mediated cleavage of APP regulates synaptotagmin-7 and presynaptic plasticity. *Nat Commun*, 9(1): 4780.
- Beck, S.J. et al., 2016. Dereglulation of mitochondrial F1FO-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 7: 11483.
- Bécot, A. et al., 2020. The Transcription Factor EB Reduces the Intraneuronal Accumulation of the Beta-Secretase-Derived APP Fragment C99 in Cellular and Mouse Alzheimer's Disease Models. *Cells*, 9(5).
- Bejanin, A. et al., 2017. Tau pathology and neurodegeneration contribute to cognitive impairment in Alzheimer's disease. *Brain*, 140(12): 3286-3300.
- Bellenguez, C., Grenier-Boley, B. and Lambert, J.C., 2020a. Genetics of Alzheimer's disease: where we are, and where we are going. *Current opinion in neurobiology*, 61: 40-48.

- Bellenguez, C. et al., 2020b. New insights on the genetic etiology of Alzheimer's and related dementia, *Neurology*.
- Belyaev, N.D., Nalivaeva, N.N., Makova, N.Z. and Turner, A.J., 2009. Nephilysin gene expression requires binding of the amyloid precursor protein intracellular domain to its promoter: implications for Alzheimer disease. *EMBO Rep*, 10(1): 94-100.
- Berger-Sweeney, J. et al., 1999. Impairments in learning and memory accompanied by neurodegeneration in mice transgenic for the carboxyl-terminus of the amyloid precursor protein. *Brain research. Molecular brain research*, 66(1-2): 150-62.
- Bergeron, R. et al., 2001. Chronic activation of AMP kinase results in NRF-1 activation and mitochondrial biogenesis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 281(6): E1340-6.
- Bess, E., Fisslthaler, B., Frömel, T. and Fleming, I., 2011. Nitric oxide-induced activation of the AMP-activated protein kinase $\alpha 2$ subunit attenuates I κ B kinase activity and inflammatory responses in endothelial cells. *PLoS one*, 6(6): e20848.
- Bhansali, S., Bhansali, A. and Dhawan, V., 2020. Metformin promotes mitophagy in mononuclear cells: a potential in vitro model for unraveling metformin's mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci*, 1463(1): 23-36.
- Bharath, L.P. et al., 2020. Metformin Enhances Autophagy and Normalizes Mitochondrial Function to Alleviate Aging-Associated Inflammation. *Cell Metab*, 32(1): 44-55.e6.
- Bhujabal, Z. et al., 2017. FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep*, 18(6): 947-961.
- Blennow, K., de Leon, M.J. and Zetterberg, H., 2006. Alzheimer's disease. *Lancet (London, England)*, 368(9533): 387-403.
- Bliss, T.M. et al., 2004. Dual-gene, dual-cell type therapy against an excitotoxic insult by bolstering neuroenergetics. *J Neurosci*, 24(27): 6202-8.
- Bobba, A. et al., 2013. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion*, 13(4): 298-311.
- Bordi, M. et al., 2016. Autophagy flux in CA1 neurons of Alzheimer hippocampus: Increased induction overburdens failing lysosomes to propel neuritic dystrophy. *Autophagy*, 12(12): 2467-2483.
- Boros, B.D. et al., 2017. Dendritic spines provide cognitive resilience against Alzheimer's disease. *Annals of neurology*, 82(4): 602-614.
- Bourgeois, A. et al., 2018. Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3 \times TgAD and 2 \times TgAD mice. *Neurobiol Aging*, 71: 21-31.
- Braak, H., Alafuzoff, I., Arzberger, T., Kretschmar, H. and Del Tredici, K., 2006. Staging of Alzheimer disease-associated neurofibrillary pathology using paraffin sections and immunocytochemistry. *Acta Neuropathol*, 112(4): 389-404.
- Braak, H. and Braak, E., 1991. Neuropathological staging of Alzheimer-related changes. *Acta Neuropathol*, 82(4): 239-59.
- Bridges, H.R., Jones, A.J., Pollak, M.N. and Hirst, J., 2014. Effects of metformin and other biguanides on oxidative phosphorylation in mitochondria. *Biochem J*, 462(3): 475-87.
- Browne, T.C. et al., 2013. IFN- γ Production by amyloid β -specific Th1 cells promotes microglial activation and increases plaque burden in a mouse model of Alzheimer's disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(5): 2241-51.
- Bubber, P., Haroutunian, V., Fisch, G., Blass, J.P. and Gibson, G.E., 2005. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer brain: mechanistic implications. *Annals of neurology*, 57(5): 695-703.
- Bukhari, H. et al., 2017. Small things matter: Implications of APP intracellular domain AICD nuclear signaling in the progression and pathogenesis of Alzheimer's disease. *Progress in neurobiology*, 156: 189-213.
- Bultot, L. et al., 2012. AMP-activated protein kinase phosphorylates and inactivates liver glycogen synthase. *Biochem J*, 443(1): 193-203.
- Bursavich, M.G., Harrison, B.A. and Blain, J.F., 2016. Gamma Secretase Modulators: New Alzheimer's Drugs on the Horizon? *Journal of medicinal chemistry*, 59(16): 7389-409.

- Bustos, V. et al., 2017a. Phosphorylated Presenilin 1 decreases β -amyloid by facilitating autophagosome-lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(27): 7148-7153.
- Bustos, V. et al., 2017b. Bidirectional regulation of A β levels by Presenilin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(27): 7142-7147.
- C, N.C. and Lynch, M.A., 2020. The role of the immune system in driving neuroinflammation. *Brain and neuroscience advances*, 4: 2398212819901082.
- C. Crdenas-Aguayo, M.d. et al., 2014. Physiological Role of Amyloid Beta in Neural Cells: The Cellular Trophic Activity. In: T. Heinbockel (Editor), *Neurochemistry*. InTech.
- Callegari, S. et al., 2017. Phospho-ubiquitin-PARK2 complex as a marker for mitophagy defects. *Autophagy*, 13(1): 201-211.
- Calvo-Rodriguez, M. et al., 2020. Increased mitochondrial calcium levels associated with neuronal death in a mouse model of Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 11(1): 2146.
- Campbell, J.M. et al., 2018. Metformin Use Associated with Reduced Risk of Dementia in Patients with Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*, 65(4): 1225-1236.
- Cao, Y. et al., 2017. Activation of γ 2-AMPK Suppresses Ribosome Biogenesis and Protects Against Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury. *Circulation research*, 121(10): 1182-1191.
- Carmona, S., Hardy, J. and Guerreiro, R., 2018. The genetic landscape of Alzheimer disease. *Handbook of clinical neurology*, 148: 395-408.
- Carroll, K.C., Viollet, B. and Suttles, J., 2013. AMPK α 1 deficiency amplifies proinflammatory myeloid APC activity and CD40 signaling. *Journal of leukocyte biology*, 94(6): 1113-21.
- Castellano, J.M. et al., 2011. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Science translational medicine*, 3(89): 89ra57.
- Castellazzi, M. et al., 2019. Autophagy and mitophagy biomarkers are reduced in sera of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Scientific Reports*, 9.
- Cecchi, C. et al., 2002. Oxidative stress and reduced antioxidant defenses in peripheral cells from familial Alzheimer's patients. *Free radical biology & medicine*, 33(10): 1372-9.
- Cen, X. et al., 2020. Pharmacological targeting of MCL-1 promotes mitophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications*, 11(1): 5731.
- Cenini, G. and Voos, W., 2019. Mitochondria as Potential Targets in Alzheimer Disease Therapy: An Update. *Front Pharmacol*, 10: 902.
- Ceyzériat, K. et al., 2018. Modulation of astrocyte reactivity improves functional deficits in mouse models of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 6(1): 104.
- Chang, J.L. et al., 2018. Targeting Amyloid- β Precursor Protein, APP, Splicing with Antisense Oligonucleotides Reduces Toxic Amyloid- β Production. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy*, 26(6): 1539-1551.
- Chasseigneaux, S. et al., 2011. Secreted amyloid precursor protein β and secreted amyloid precursor protein α induce axon outgrowth in vitro through Egr1 signaling pathway. *PloS one*, 6(1): e16301.
- Chavez, J.A., Roach, W.G., Keller, S.R., Lane, W.S. and Lienhard, G.E., 2008. Inhibition of GLUT4 translocation by Tbc1d1, a Rab GTPase-activating protein abundant in skeletal muscle, is partially relieved by AMP-activated protein kinase activation. *J Biol Chem*, 283(14): 9187-95.
- Checler, F., Afram, E., Pardossi-Piquard, R. and Lauritzen, I., 2021. Is γ -secretase a beneficial inactivating enzyme of the toxic APP C-terminal fragment C99? *J Biol Chem*, 296: 100489.
- Chen, C.C. et al., 2014a. Amelioration of LPS-induced inflammation response in microglia by AMPK activation. *BioMed research international*, 2014: 692061.
- Chen, G. et al., 2014b. A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Molecular cell*, 54(3): 362-77.
- Chen, J.L. et al., 2019. Metformin attenuates diabetes-induced tau hyperphosphorylation in vitro and in vivo by enhancing autophagic clearance. *Exp Neurol*, 311: 44-56.
- Chen, J.X. and Yan, S.S., 2010. Role of mitochondrial amyloid-beta in Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2: S569-78.
- Chen, M.K. et al., 2018. Assessing Synaptic Density in Alzheimer Disease With Synaptic Vesicle Glycoprotein 2A Positron Emission Tomographic Imaging. *JAMA neurology*, 75(10): 1215-1224.

- Chen, X.Q. et al., 2021a. Targeting increased levels of APP in Down syndrome: Posiphen-mediated reductions in APP and its products reverse endosomal phenotypes in the Ts65Dn mouse model. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 17(2): 271-292.
- Chen, Y. et al., 2021b. Metformin attenuates plaque-associated tau pathology and reduces amyloid- β burden in APP/PS1 mice. *Alzheimers Res Ther*, 13(1): 40.
- Chen, Y. et al., 2009. Antidiabetic drug metformin (GlucophageR) increases biogenesis of Alzheimer's amyloid peptides via up-regulating BACE1 transcription. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10): 3907-12.
- Cheng, X. et al., 2017. Pacer Mediates the Function of Class III PI3K and HOPS Complexes in Autophagosome Maturation by Engaging Stx17. *Molecular cell*, 65(6): 1029-1043.e5.
- Cheung, P.C., Salt, I.P., Davies, S.P., Hardie, D.G. and Carling, D., 2000. Characterization of AMP-activated protein kinase gamma-subunit isoforms and their role in AMP binding. *Biochem J*, 346 Pt 3(Pt 3): 659-69.
- Chiang, M.C., Cheng, Y.C., Chen, S.J., Yen, C.H. and Huang, R.N., 2016. Metformin activation of AMPK-dependent pathways is neuroprotective in human neural stem cells against Amyloid-beta-induced mitochondrial dysfunction. *Exp Cell Res*, 347(2): 322-31.
- Chin-Hsiao, T., 2019. Metformin and the Risk of Dementia in Type 2 Diabetes Patients. *Aging Dis*, 10(1): 37-48.
- Cho, D.H. et al., 2009. S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science*, 324(5923): 102-5.
- Chu, C.T. et al., 2013. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*, 15(10): 1197-1205.
- Coburger, I., Hoefgen, S. and Than, M.E., 2014. The structural biology of the amyloid precursor protein APP - a complex puzzle reveals its multi-domain architecture. *Biological chemistry*, 395(5): 485-98.
- Coffey, E.E., Beckel, J.M., Laties, A.M. and Mitchell, C.H., 2014. Lysosomal alkalization and dysfunction in human fibroblasts with the Alzheimer's disease-linked presenilin 1 A246E mutation can be reversed with cAMP. *Neuroscience*, 263: 111-24.
- Cool, B. et al., 2006. Identification and characterization of a small molecule AMPK activator that treats key components of type 2 diabetes and the metabolic syndrome. *Cell Metab*, 3(6): 403-16.
- Corsetti, V. et al., 2015. NH2-truncated human tau induces deregulated mitophagy in neurons by aberrant recruitment of Parkin and UCHL-1: implications in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 24(11): 3058-3081.
- Cramer, P.E. et al., 2012. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science (New York, N.Y.)*, 335(6075): 1503-1506.
- Cristiano, C. et al., 2019. Neutralization of IL-17 rescues amyloid- β -induced neuroinflammation and memory impairment. *British journal of pharmacology*, 176(18): 3544-3557.
- Csordás, G. et al., 2006. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J Cell Biol*, 174(7): 915-21.
- Cummings, J.L. et al., 2016. Double-blind, placebo-controlled, proof-of-concept trial of bexarotene in moderate Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther*, 8: 4.
- Cummins, N., Tweedie, A., Zuryn, S., Bertran-Gonzalez, J. and Götz, J., 2019. Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria. *The EMBO journal*, 38(3).
- Cwynar-Zajac, Ł., 2021. Metformin - a new approach. *Pediatric endocrinology, diabetes, and metabolism*, 27(2): 134-140.
- Dagher, Z., Ruderman, N., Tornheim, K. and Ido, Y., 2001. Acute regulation of fatty acid oxidation and amp-activated protein kinase in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation research*, 88(12): 1276-82.
- Dansokho, C. et al., 2016. Regulatory T cells delay disease progression in Alzheimer-like pathology. *Brain*, 139(Pt 4): 1237-51.
- Davies, S.P., Helps, N.R., Cohen, P.T. and Hardie, D.G., 1995. 5'-AMP inhibits dephosphorylation, as well as promoting phosphorylation, of the AMP-activated protein kinase. Studies using bacterially expressed human protein phosphatase-2C alpha and native bovine protein phosphatase-2AC. *FEBS letters*, 377(3): 421-5.

- de la Monte, S.M., Luong, T., Neely, T.R., Robinson, D. and Wands, J.R., 2000. Mitochondrial DNA damage as a mechanism of cell loss in Alzheimer's disease. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 80(8): 1323-35.
- Deas, E. et al., 2011. PINK1 cleavage at position A103 by the mitochondrial protease PARL. *Hum Mol Genet*, 20(5): 867-79.
- Del Prete, D. et al., 2017. Localization and Processing of the Amyloid- β Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes. *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(4): 1549-1570.
- Deng, J. et al., 2015. Soluble amyloid precursor protein alpha inhibits tau phosphorylation through modulation of GSK3 β signaling pathway. *Journal of neurochemistry*, 135(3): 630-7.
- Denton, R.M., 2009. Regulation of mitochondrial dehydrogenases by calcium ions. *Biochimica et biophysica acta*, 1787(11): 1309-16.
- Derave, W. et al., 2000. Dissociation of AMP-activated protein kinase activation and glucose transport in contracting slow-twitch muscle. *Diabetes*, 49(8): 1281-7.
- Devi, L. and Ohno, M., 2012. Mitochondrial dysfunction and accumulation of the β -secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neurobiol Dis*, 45(1): 417-24.
- Devi, L., Prabhu, B.M., Galati, D.F., Avadhani, N.G. and Anandatheerthavarada, H.K., 2006. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J Neurosci*, 26(35): 9057-68.
- DiSabato, D.J., Quan, N. and Godbout, J.P., 2016. Neuroinflammation: the devil is in the details. *Journal of neurochemistry*, 139 Suppl 2(Suppl 2): 136-153.
- DiTacchio, K.A., Heinemann, S.F. and Dziewczapolski, G., 2015. Metformin treatment alters memory function in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Alzheimers Dis*, 44(1): 43-8.
- Dite, T.A. et al., 2018. AMP-activated protein kinase selectively inhibited by the type II inhibitor SBI-0206965. *J Biol Chem*, 293(23): 8874-8885.
- Domise, M. et al., 2016. AMP-activated protein kinase modulates tau phosphorylation and tau pathology in vivo. *Sci Rep*, 6: 26758.
- Doody, R.S. et al., 2013. A phase 3 trial of semagacestat for treatment of Alzheimer's disease. *The New England journal of medicine*, 369(4): 341-50.
- Drabik, K. et al., 2021. Effect of Chronic Stress Present in Fibroblasts Derived from Patients with a Sporadic Form of AD on Mitochondrial Function and Mitochondrial Turnover. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*, 10(6).
- Du, F. et al., 2017. PINK1 signalling rescues amyloid pathology and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*, 140(12): 3233-3251.
- Du, F., Yu, Q. and Yan, S.S., 2021. PINK1 Activation Attenuates Impaired Neuronal-Like Differentiation and Synaptogenesis and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease Trans-Mitochondrial Cybrid Cells. *J Alzheimers Dis*, 81(4): 1749-1761.
- Du, H. et al., 2008. Cyclophilin D deficiency attenuates mitochondrial and neuronal perturbation and ameliorates learning and memory in Alzheimer's disease. *Nat Med*, 14(10): 1097-105.
- Du, H. et al., 2010. Early deficits in synaptic mitochondria in an Alzheimer's disease mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(43): 18670-5.
- Du, H., Guo, L., Zhang, W., Rydzewska, M. and Yan, S., 2011. Cyclophilin D deficiency improves mitochondrial function and learning/memory in aging Alzheimer disease mouse model. *Neurobiol Aging*, 32(3): 398-406.
- Du, L.L. et al., 2015. AMPK activation ameliorates Alzheimer's disease-like pathology and spatial memory impairment in a streptozotocin-induced Alzheimer's disease model in rats. *J Alzheimers Dis*, 43(3): 775-84.
- Dubey, M., Chaudhury, P., Kabiru, H. and Shea, T.B., 2008. Tau inhibits anterograde axonal transport and perturbs stability in growing axonal neurites in part by displacing kinesin cargo: neurofilaments attenuate tau-mediated neurite instability. *Cell motility and the cytoskeleton*, 65(2): 89-99.
- Ducommun, S. et al., 2015. Motif affinity and mass spectrometry proteomic approach for the discovery of cellular AMPK targets: identification of mitochondrial fission factor as a new AMPK substrate. *Cellular signalling*, 27(5): 978-88.

- Duplan, E. et al., 2013. Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription. *Journal of molecular cell biology*, 5(2): 132-42.
- Durante, P.E., Mustard, K.J., Park, S.H., Winder, W.W. and Hardie, D.G., 2002. Effects of endurance training on activity and expression of AMP-activated protein kinase isoforms in rat muscles. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 283(1): E178-86.
- Edbauer, D., Willem, M., Lammich, S., Steiner, H. and Haass, C., 2002. Insulin-degrading enzyme rapidly removes the beta-amyloid precursor protein intracellular domain (AICD). *J Biol Chem*, 277(16): 13389-93.
- Egan, D.F. et al., 2015. Small Molecule Inhibition of the Autophagy Kinase ULK1 and Identification of ULK1 Substrates. *Molecular cell*, 59(2): 285-97.
- Egan, D.F. et al., 2011. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy. *Science*, 331(6016): 456-61.
- Eggert, S. et al., 2004. The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem*, 279(18): 18146-56.
- Eguchi, S. et al., 2009. AMP-activated protein kinase phosphorylates glutamine : fructose-6-phosphate amidotransferase 1 at Ser243 to modulate its enzymatic activity. *Genes to cells : devoted to molecular & cellular mechanisms*, 14(2): 179-89.
- Eichner, L.J. and Giguère, V., 2011. Estrogen related receptors (ERRs): a new dawn in transcriptional control of mitochondrial gene networks. *Mitochondrion*, 11(4): 544-52.
- Eisenberg, T. et al., 2009. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology*, 11(11): 1305-1314.
- Emmerzaal, T.L. et al., 2018. Age-Dependent Decrease of Mitochondrial Complex II Activity in a Familial Mouse Model for Alzheimer's Disease. *J Alzheimers Dis*, 66(1): 75-82.
- Esang, M. and Gupta, M., 2021. Aducanumab as a Novel Treatment for Alzheimer's Disease: A Decade of Hope, Controversies, and the Future. *Cureus*, 13(8): e17591.
- Escartin, C. et al., 2021. Reactive astrocyte nomenclature, definitions, and future directions. *Nat Neurosci*, 24(3): 312-325.
- Esteban-Martinez, L. et al., 2017. Programmed mitophagy is essential for the glycolytic switch during cell differentiation. *EMBO J*, 36(12): 1688-1706.
- Evin, G. and Li, Q.X., 2012. Platelets and Alzheimer's disease: Potential of APP as a biomarker. *World journal of psychiatry*, 2(6): 102-13.
- Evin, G., Zhu, A., Holsinger, R.M., Masters, C.L. and Li, Q.X., 2003. Proteolytic processing of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein in brain and platelets. *Journal of neuroscience research*, 74(3): 386-92.
- Eysert, F. et al., 2020. Molecular Dysfunctions of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) in Alzheimer's Disease. *Int J Mol Sci*, 21(24).
- Fang, E.F. et al., 2019. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*, 22(3): 401-412.
- Fanutza, T., Del Prete, D., Ford, M.J., Castillo, P.E. and D'Adamio, L., 2015. APP and APLP2 interact with the synaptic release machinery and facilitate transmitter release at hippocampal synapses. *Elife*, 4: e09743.
- Ferreira, D., Nordberg, A. and Westman, E., 2020. Biological subtypes of Alzheimer disease: A systematic review and meta-analysis. *Neurology*, 94(10): 436-448.
- Ferreira, I.L. et al., 2015. A β and NMDAR activation cause mitochondrial dysfunction involving ER calcium release. *Neurobiol Aging*, 36(2): 680-92.
- Filadi, R. et al., 2016. Presenilin 2 Modulates Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Coupling by Tuning the Antagonistic Effect of Mitofusin 2. *Cell reports*, 15(10): 2226-2238.
- Flammang, B. et al., 2012. Evidence that the amyloid- β protein precursor intracellular domain, AICD, derives from β -secretase-generated C-terminal fragment. *J Alzheimers Dis*, 30(1): 145-53.
- Flowers, S.A. and Rebeck, G.W., 2020. APOE in the normal brain. *Neurobiol Dis*, 136: 104724.
- Fol, R. et al., 2016. Viral gene transfer of APP α rescues synaptic failure in an Alzheimer's disease mouse model. *Acta Neuropathol*, 131(2): 247-266.
- Foretz, M., Guigas, B., Bertrand, L., Pollak, M. and Viollet, B., 2014. Metformin: from mechanisms of action to therapies. *Cell Metab*, 20(6): 953-66.

- Frøsig, C., Jørgensen, S.B., Hardie, D.G., Richter, E.A. and Wojtaszewski, J.F., 2004. 5'-AMP-activated protein kinase activity and protein expression are regulated by endurance training in human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 286(3): E411-7.
- Fu, M. et al., 2013. Regulation of mitophagy by the Gp78 E3 ubiquitin ligase. *Molecular biology of the cell*, 24(8): 1153-62.
- Fullerton, M.D. et al., 2013. Single phosphorylation sites in Acc1 and Acc2 regulate lipid homeostasis and the insulin-sensitizing effects of metformin. *Nat Med*, 19(12): 1649-54.
- Furukawa, K. et al., 1996. Increased activity-regulating and neuroprotective efficacy of alpha-secretase-derived secreted amyloid precursor protein conferred by a C-terminal heparin-binding domain. *Journal of neurochemistry*, 67(5): 1882-96.
- Gaikwad, S. et al., 2021. Tau oligomer induced HMGB1 release contributes to cellular senescence and neuropathology linked to Alzheimer's disease and frontotemporal dementia. *Cell reports*, 36(3): 109419.
- Galasso, A., Cameron, C.S., Frenguelli, B.G. and Moffat, K.G., 2017. An AMPK-dependent regulatory pathway in tau-mediated toxicity. *Biology open*, 6(10): 1434-1444.
- Galic, S. et al., 2011. Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest*, 121(12): 4903-15.
- Gao, Y. et al., 2020. Tetrahydroxy stilbene glycoside alleviated inflammatory damage by mitophagy via AMPK related PINK1/Parkin signaling pathway. *Biochemical Pharmacology*, 177: 113997.
- García-Ayllón, M.S. et al., 2017. C-terminal fragments of the amyloid precursor protein in cerebrospinal fluid as potential biomarkers for Alzheimer disease. *Sci Rep*, 7(1): 2477.
- García-González, L. et al., 2021. MT5-MMP controls APP and β -CTF/C99 metabolism through proteolytic-dependent and -independent mechanisms relevant for Alzheimer's disease. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 35(7): e21727.
- García-Haro, L. et al., 2010. The PP1-R6 protein phosphatase holoenzyme is involved in the glucose-induced dephosphorylation and inactivation of AMP-activated protein kinase, a key regulator of insulin secretion, in MIN6 beta cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 24(12): 5080-91.
- García-Roves, P.M., Osler, M.E., Holmström, M.H. and Zierath, J.R., 2008. Gain-of-function R225Q mutation in AMP-activated protein kinase gamma3 subunit increases mitochondrial biogenesis in glycolytic skeletal muscle. *J Biol Chem*, 283(51): 35724-34.
- Gelmetti, V. et al., 2017. PINK1 and BECN1 relocate at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. *Autophagy*, 13(4): 654-669.
- Gersbacher, M.T. et al., 2013. Turnover of amyloid precursor protein family members determines their nuclear signaling capability. *PloS one*, 8(7): e69363.
- Ghislat, G., Patron, M., Rizzuto, R. and Knecht, E., 2012. Withdrawal of essential amino acids increases autophagy by a pathway involving Ca²⁺/calmodulin-dependent kinase kinase- β (CaMKK- β). *J Biol Chem*, 287(46): 38625-36.
- Gibson, G.E. and Shi, Q., 2010. A mitocentric view of Alzheimer's disease suggests multi-faceted treatments. *J Alzheimers Dis*, 20 Suppl 2(0 2): S591-607.
- Glancy, B., Willis, W.T., Chess, D.J. and Balaban, R.S., 2013. Effect of calcium on the oxidative phosphorylation cascade in skeletal muscle mitochondria. *Biochemistry*, 52(16): 2793-809.
- Goate, A. et al., 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 349(6311): 704-6.
- Goiran, T. et al., 2018. β -Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Controls Mitochondrial Function by Modulating Phosphatase and Tensin Homolog-Induced Kinase 1 Transcription in Cells and in Alzheimer Mice Models. *Biological Psychiatry*, 83(5): 416-427.
- Gowans, G.J., Hawley, S.A., Ross, F.A. and Hardie, D.G., 2013. AMP is a true physiological regulator of AMP-activated protein kinase by both allosteric activation and enhancing net phosphorylation. *Cell Metab*, 18(4): 556-66.
- Green, D.R. and Kroemer, G., 2004. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science*, 305(5684): 626-9.

- Greene, A.W. et al., 2012. Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment. *EMBO Rep*, 13(4): 378-85.
- Group, A.s.D.C., 1995. The structure of the presenilin 1 (S182) gene and identification of six novel mutations in early onset AD families. *Nature genetics*, 11(2): 219-22.
- Gudala, K., Bansal, D., Schifano, F. and Bhansali, A., 2013. Diabetes mellitus and risk of dementia: A meta-analysis of prospective observational studies. *Journal of diabetes investigation*, 4(6): 640-50.
- Guglielmotto, M. et al., 2014. A β 1-42 monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy*, 10(10): 1827-1843.
- Guha, S., Fischer, S., Johnson, G.V.W. and Nehrke, K., 2020. Tauopathy-associated tau modifications selectively impact neurodegeneration and mitophagy in a novel *C. elegans* single-copy transgenic model. *Molecular Neurodegeneration*, 15(1): 65.
- Gwinn, D.M. et al., 2008. AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Molecular cell*, 30(2): 214-26.
- Habib, A., Sawmiller, D. and Tan, J., 2017. Restoring Soluble Amyloid Precursor Protein α Functions as a Potential Treatment for Alzheimer's Disease. *Journal of neuroscience research*, 95(4): 973-991.
- Han, S., Jeong, Y.Y., Sheshadri, P., Su, X. and Cai, Q., 2020a. Mitophagy regulates integrity of mitochondria at synapses and is critical for synaptic maintenance. *EMBO Rep*, 21(9): e49801.
- Han, Y., Wang, N., Kang, J. and Fang, Y., 2020b. β -Asarone improves learning and memory in A β 1-42-induced Alzheimer's disease rats by regulating PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Metabolic Brain Disease*.
- Handa, N. et al., 2011. Structural basis for compound C inhibition of the human AMP-activated protein kinase α 2 subunit kinase domain. *Acta crystallographica. Section D, Biological crystallography*, 67(Pt 5): 480-7.
- Hansson Petersen, C.A. et al., 2008. The amyloid beta-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(35): 13145-50.
- Hardy, J.A. and Higgins, G.A., 1992. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science*, 256(5054): 184-5.
- Hasegawa, H., Liu, L., Tooyama, I., Murayama, S. and Nishimura, M., 2014. The FAM3 superfamily member ILEI ameliorates Alzheimer's disease-like pathology by destabilizing the penultimate amyloid- β precursor. *Nat Commun*, 5: 3917.
- Hashioka, S. et al., 2007. Phosphatidylserine and phosphatidylcholine-containing liposomes inhibit amyloid beta and interferon-gamma-induced microglial activation. *Free radical biology & medicine*, 42(7): 945-54.
- Hasson, S.A. et al., 2013. High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature*, 504(7479): 291-5.
- Hawkes, C.A. and McLaurin, J., 2009. Selective targeting of perivascular macrophages for clearance of beta-amyloid in cerebral amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(4): 1261-6.
- Hawley, S.A. et al., 2003. Complexes between the LKB1 tumor suppressor, STRAD alpha/beta and MO25 alpha/beta are upstream kinases in the AMP-activated protein kinase cascade. *Journal of biology*, 2(4): 28.
- Hawley, S.A. et al., 1995. 5'-AMP activates the AMP-activated protein kinase cascade, and Ca²⁺/calmodulin activates the calmodulin-dependent protein kinase I cascade, via three independent mechanisms. *J Biol Chem*, 270(45): 27186-91.
- Hedskog, L. et al., 2013. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 110(19): 7916-21.
- Heinisch, J.J. and Brandt, R., 2016. Signaling pathways and posttranslational modifications of tau in Alzheimer's disease: the humanization of yeast cells. *Microbial cell (Graz, Austria)*, 3(4): 135-146.
- Heneka, M.T. et al., 2015. Neuroinflammation in Alzheimer's disease. *The Lancet. Neurology*, 14(4): 388-405.

- Heo, J.M., Ordureau, A., Paulo, J.A., Rinehart, J. and Harper, J.W., 2015. The PINK1-PARKIN Mitochondrial Ubiquitylation Pathway Drives a Program of OPTN/NDP52 Recruitment and TBK1 Activation to Promote Mitophagy. *Molecular cell*, 60(1): 7-20.
- Herrero-Martín, G. et al., 2009. TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells. *Embo j*, 28(6): 677-85.
- Herzig, S. and Shaw, R.J., 2018. AMPK: guardian of metabolism and mitochondrial homeostasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 19(2): 121-135.
- Hettich, M.M. et al., 2014. The anti-diabetic drug metformin reduces BACE1 protein level by interfering with the MID1 complex. *PLoS one*, 9(7): e102420.
- Hick, M. et al., 2015. Acute function of secreted amyloid precursor protein fragment APP_s in synaptic plasticity. *Acta Neuropathol*, 129(1): 21-37.
- Hinchey, E.C. et al., 2018. Mitochondria-derived ROS activate AMP-activated protein kinase (AMPK) indirectly. *J Biol Chem*, 293(44): 17208-17217.
- Hirai, K. et al., 2001. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 21(9): 3017-3023.
- Hoffman, N.J. et al., 2015. Global Phosphoproteomic Analysis of Human Skeletal Muscle Reveals a Network of Exercise-Regulated Kinases and AMPK Substrates. *Cell Metab*, 22(5): 922-35.
- Hoffman, N.J. et al., 2020. Genetic loss of AMPK-glycogen binding destabilises AMPK and disrupts metabolism. *Molecular metabolism*, 41: 101048.
- Hong, Y.H., Varanasi, U.S., Yang, W. and Leff, T., 2003. AMP-activated protein kinase regulates HNF4 α transcriptional activity by inhibiting dimer formation and decreasing protein stability. *J Biol Chem*, 278(30): 27495-501.
- Hoppe, S. et al., 2009. AMP-activated protein kinase adapts rRNA synthesis to cellular energy supply. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(42): 17781-6.
- Hou, X. et al., 2020. Mitophagy alterations in Alzheimer's disease are associated with granulovacuolar degeneration and early tau pathology. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*.
- Houacine, J., Bolmont, T., Aeschbach, L., Oulad-Abdelghani, M. and Fraering, P.C., 2012. Selective neutralization of APP-C99 with monoclonal antibodies reduces the production of Alzheimer's A β peptides. *Neurobiol Aging*, 33(11): 2704-14.
- Hu, W., Wang, Z. and Zheng, H., 2018. Mitochondrial accumulation of amyloid β (A β) peptides requires TOMM22 as a main A β receptor in yeast. *J Biol Chem*, 293(33): 12681-12689.
- Hu, Y. et al., 2016. Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin. *Oncotarget*, 7(14): 17356-17368.
- Hung, C.M. et al., 2021. AMPK/ULK1-mediated phosphorylation of Parkin ACT domain mediates an early step in mitophagy. *Sci Adv*, 7(15).
- Hung, C.O.Y. and Livesey, F.J., 2018. Altered γ -Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease. *Cell reports*, 25(13): 3647-3660.e2.
- Inoki, K., Zhu, T. and Guan, K.L., 2003. TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115(5): 577-90.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C. and Mizushima, N., 2012. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell*, 151(6): 1256-69.
- Ittner, L.M. et al., 2010. Dendritic function of tau mediates amyloid-beta toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell*, 142(3): 387-97.
- Jack, C.R., Jr. et al., 2018. NIA-AA Research Framework: Toward a biological definition of Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 14(4): 535-562.
- Jadiya, P. et al., 2019. Impaired mitochondrial calcium efflux contributes to disease progression in models of Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 10(1): 3885.
- Jäger, S., Handschin, C., St-Pierre, J. and Spiegelman, B.M., 2007. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α . *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29): 12017-22.
- Jäger, S. et al., 2009. alpha-secretase mediated conversion of the amyloid precursor protein derived membrane stub C99 to C83 limits Abeta generation. *Journal of neurochemistry*, 111(6): 1369-82.

- Jara, C., Aránguiz, A., Cerpa, W., Tapia-Rojas, C. and Quintanilla, R.A., 2018. Genetic ablation of tau improves mitochondrial function and cognitive abilities in the hippocampus. *Redox biology*, 18: 279-294.
- Jefferson, T. et al., 2011. Metalloprotease meprin beta generates nontoxic N-terminal amyloid precursor protein fragments in vivo. *J Biol Chem*, 286(31): 27741-50.
- Jeong, H.W. et al., 2009. Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 296(4): E955-64.
- Jia, J. et al., 2020. AMPK, a Regulator of Metabolism and Autophagy, Is Activated by Lysosomal Damage via a Novel Galectin-Directed Ubiquitin Signal Transduction System. *Molecular cell*, 77(5): 951-969.e9.
- Jiang, P. et al., 2014. The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular biology of the cell*, 25(8): 1327-37.
- Jiang, Y. et al., 2019. Lysosomal Dysfunction in Down Syndrome Is APP-Dependent and Mediated by APP- β CTF (C99). *J Neurosci*, 39(27): 5255-5268.
- Johnston, J.A. et al., 2008. Platelet beta-secretase activity is increased in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 29(5): 661-8.
- Jonsson, T. et al., 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*, 488(7409): 96-9.
- Joo, J.H. et al., 2011. Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy. *Molecular cell*, 43(4): 572-85.
- Joseph, B.K. et al., 2015. Inhibition of AMP Kinase by the Protein Phosphatase 2A Heterotrimer, PP2A^{pp2r2d}. *J Biol Chem*, 290(17): 10588-98.
- Joshi, A.U. et al., 2019. Fragmented mitochondria released from microglia trigger A1 astrocytic response and propagate inflammatory neurodegeneration. *Nat Neurosci*, 22(10): 1635-1648.
- Ju, J. and Zhou, Q., 2018. *Dendritic Spine Modifications in Brain Physiology*. IntechOpen.
- Ju, T.C. et al., 2011. Nuclear translocation of AMPK- α 1 potentiates striatal neurodegeneration in Huntington's disease. *J Cell Biol*, 194(2): 209-27.
- Kalyanaraman, B. et al., 2017. Modified Metformin as a More Potent Anticancer Drug: Mitochondrial Inhibition, Redox Signaling, Antiproliferative Effects and Future EPR Studies. *Cell biochemistry and biophysics*, 75(3-4): 311-317.
- Kamoshita, M., Fujinami, K., Toda, E., Tsubota, K. and Ozawa, Y., 2016. Neuroprotective effect of activated 5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase on cone system function during retinal inflammation. *BMC neuroscience*, 17(1): 32.
- Kanemitsu, H., Tomiyama, T. and Mori, H., 2003. Human neprilysin is capable of degrading amyloid beta peptide not only in the monomeric form but also the pathological oligomeric form. *Neurosci Lett*, 350(2): 113-6.
- Kaur, G. et al., 2017. Lysosomal dysfunction in the brain of a mouse model with intraneuronal accumulation of carboxyl terminal fragments of the amyloid precursor protein. *Molecular psychiatry*, 22(7): 981-989.
- Kawaguchi, T., Osatomi, K., Yamashita, H., Kabashima, T. and Uyeda, K., 2002. Mechanism for fatty acid "sparing" effect on glucose-induced transcription: regulation of carbohydrate-responsive element-binding protein by AMP-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 277(6): 3829-35.
- Kazgan, N., Williams, T., Forsberg, L.J. and Brenman, J.E., 2010. Identification of a nuclear export signal in the catalytic subunit of AMP-activated protein kinase. *Molecular biology of the cell*, 21(19): 3433-42.
- Keren-Shaul, H. et al., 2017. A Unique Microglia Type Associated with Restricting Development of Alzheimer's Disease. *Cell*, 169(7): 1276-1290.e17.
- Khalifeh, M., Read, M.I., Barreto, G.E. and Sahebkar, A., 2020. Trehalose against Alzheimer's Disease: Insights into a Potential Therapy. *Bioessays*, 42(8): e1900195.
- Khatter, D. et al., 2015. The small GTPase Arl8b regulates assembly of the mammalian HOPS complex on lysosomes. *Journal of cell science*, 128(9): 1746-61.
- Kickstein, E. et al., 2010. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50): 21830-5.

- Kim, B., Figueroa-Romero, C., Pacut, C., Backus, C. and Feldman, E.L., 2015. Insulin Resistance Prevents AMPK-induced Tau Dephosphorylation through Akt-mediated Increase in AMPK Ser-485 Phosphorylation. *J Biol Chem*, 290(31): 19146-57.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B. and Guan, K.L., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol*, 13(2): 132-41.
- Kim, J.H. et al., 2010. Phospholipase D1 mediates AMP-activated protein kinase signaling for glucose uptake. *PloS one*, 5(3): e9600.
- Kim, N. et al., 2014. AMPK α 2 translocates into the nucleus and interacts with hnRNP H: implications in metformin-mediated glucose uptake. *Cellular signalling*, 26(9): 1800-6.
- Kim, S.H., Vlkolinsky, R., Cairns, N. and Lubec, G., 2000. Decreased levels of complex III core protein 1 and complex V beta chain in brains from patients with Alzheimer's disease and Down syndrome. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 57(12): 1810-6.
- Kim, Y.J. et al., 2017. Association between Mitofusin 2 Gene Polymorphisms and Late-Onset Alzheimer's Disease in the Korean Population. *Psychiatry investigation*, 14(1): 81-85.
- Kirmess, K.M. et al., 2021. The PrecivityAD™ test: Accurate and reliable LC-MS/MS assays for quantifying plasma amyloid beta 40 and 42 and apolipoprotein E proteotype for the assessment of brain amyloidosis. *Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry*, 519: 267-275.
- Knopman, D.S., Jones, D.T. and Greicius, M.D., 2021. Failure to demonstrate efficacy of aducanumab: An analysis of the EMERGE and ENGAGE trials as reported by Biogen, December 2019. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 17(4): 696-701.
- Koenig, A.M. et al., 2017. Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease: Pilot Data From a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*, 31(2): 107-113.
- Koffie, R.M. et al., 2012. Apolipoprotein E4 effects in Alzheimer's disease are mediated by synaptotoxic oligomeric amyloid- β . *Brain*, 135(Pt 7): 2155-68.
- Koffie, R.M. et al., 2009. Oligomeric amyloid beta associates with postsynaptic densities and correlates with excitatory synapse loss near senile plaques. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106(10): 4012-7.
- Koo, S.H. et al., 2005. The CREB coactivator TORC2 is a key regulator of fasting glucose metabolism. *Nature*, 437(7062): 1109-11.
- Kraft, A.W. et al., 2013. Attenuating astrocyte activation accelerates plaque pathogenesis in APP/PS1 mice. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 27(1): 187-98.
- Krawczyk, C.M. et al., 2010. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*, 115(23): 4742-9.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C., 2007. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiological reviews*, 87(1): 99-163.
- Kuang, X. et al., 2017. Neuroprotective Effect of Ligustilide through Induction of α -Secretase Processing of Both APP and Klotho in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Front Aging Neurosci*, 9: 353.
- Kuhn, A.J., Abrams, B.S., Knowlton, S. and Raskatov, J.A., 2020. Alzheimer's Disease "Non-amyloidogenic" p3 Peptide Revisited: A Case for Amyloid- α . *ACS chemical neuroscience*, 11(11): 1539-1544.
- Kuhn, A.J. and Raskatov, J., 2020. Is the p3 Peptide (A β 17-40, A β 17-42) Relevant to the Pathology of Alzheimer's Disease?1. *J Alzheimers Dis*, 74(1): 43-53.
- Kunkle, B.W. et al., 2019. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nature genetics*, 51(3): 414-430.
- Kwart, D. et al., 2019. A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP β -CTFs, Not A β . *Neuron*, 104(2): 256-270.e5.
- Labuzek, K., Liber, S., Gabryel, B., Adamczyk, J. and Okopień, B., 2010. Metformin increases phagocytosis and acidifies lysosomal/endosomal compartments in AMPK-dependent manner in rat primary microglia. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 381(2): 171-86.
- Lacour, M. et al., 2019. Causative Mutations and Genetic Risk Factors in Sporadic Early Onset Alzheimer's Disease Before 51 Years. *J Alzheimers Dis*, 71(1): 227-243.

- Lane-Donovan, C. and Herz, J., 2017. The ApoE receptors Vldlr and Apoer2 in central nervous system function and disease. *Journal of lipid research*, 58(6): 1036-1043.
- Larner, A.J., 1999. Hypothesis: amyloid beta-peptides truncated at the N-terminus contribute to the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*, 20(1): 65-9.
- Lau, D.H. et al., 2016. Critical residues involved in tau binding to fyn: implications for tau phosphorylation in Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 4(1): 49.
- Lauritzen, I. et al., 2019. Targeting γ -secretase triggers the selective enrichment of oligomeric APP-CTFs in brain extracellular vesicles from Alzheimer cell and mouse models. *Translational neurodegeneration*, 8: 35.
- Lauritzen, I. et al., 2012. The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci*, 32(46): 16243-1655a.
- Lauritzen, I. et al., 2016. Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathologica*, 132: 257-276.
- Lawrence, R.E. and Zoncu, R., 2019. The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control. *Nat Cell Biol*, 21(2): 133-142.
- Laws, K.R., Irvine, K. and Gale, T.M., 2018. Sex differences in Alzheimer's disease. *Current opinion in psychiatry*, 31(2): 133-139.
- Lazarou, M., Jin, S.M., Kane, L.A. and Youle, R.J., 2012. Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin. *Developmental cell*, 22(2): 320-33.
- Lazarou, M. et al., 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565): 309-314.
- Le Ber, I. et al., 2013. SQSTM1 mutations in French patients with frontotemporal dementia or frontotemporal dementia with amyotrophic lateral sclerosis. *JAMA neurology*, 70(11): 1403-10.
- Lee, J.H. et al., 2010a. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*, 141(7): 1146-58.
- Lee, J.W., Park, S., Takahashi, Y. and Wang, H.G., 2010b. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PloS one*, 5(11): e15394.
- Lee, S.H., Bolshakov, V.Y. and Shen, J., 2021a. Inactivation of Presenilin in inhibitory neurons results in decreased GABAergic responses and enhanced synaptic plasticity. *Molecular brain*, 14(1): 85.
- Lee, S.I. et al., 2021b. APOE4-carrying human astrocytes oversupply cholesterol to promote neuronal lipid raft expansion and A β generation. *Stem cell reports*.
- Leng, F. and Edison, P., 2021. Neuroinflammation and microglial activation in Alzheimer disease: where do we go from here? *Nature reviews. Neurology*, 17(3): 157-172.
- Leprivier, G. et al., 2013. The eEF2 kinase confers resistance to nutrient deprivation by blocking translation elongation. *Cell*, 153(5): 1064-79.
- Li, C. et al., 2018. Inhibitory Effects of Betulinic Acid on LPS-Induced Neuroinflammation Involve M2 Microglial Polarization via CaMKK β -Dependent AMPK Activation. *Front Mol Neurosci*, 11: 98.
- Li, M. et al., 2019. Transient Receptor Potential V Channels Are Essential for Glucose Sensing by Aldolase and AMPK. *Cell Metab*, 30(3): 508-524.e12.
- Li, X. et al., 2015. Structural basis of AMPK regulation by adenine nucleotides and glycogen. *Cell research*, 25(1): 50-66.
- Li, Y. et al., 2011. AMPK phosphorylates and inhibits SREBP activity to attenuate hepatic steatosis and atherosclerosis in diet-induced insulin-resistant mice. *Cell Metab*, 13(4): 376-388.
- Liang, J. et al., 2015. Myristoylation confers noncanonical AMPK functions in autophagy selectivity and mitochondrial surveillance. *Nat Commun*, 6: 7926.
- Liddel, S.A. et al., 2017. Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature*, 541(7638): 481-487.
- Lin, S.C. and Hardie, D.G., 2018. AMPK: Sensing Glucose as well as Cellular Energy Status. *Cell Metab*, 27(2): 299-313.

- Liu, C.C. et al., 2021. APOE3-Jacksonville (V236E) variant reduces self-aggregation and risk of dementia. *Science translational medicine*, 13(613): eabc9375.
- Liu, L. et al., 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 14(2): 177-85.
- Liu, W.W. et al., 2007. Elevated platelet beta-secretase activity in mild cognitive impairment. *Dementia and geriatric cognitive disorders*, 24(6): 464-8.
- Losón, O.C., Song, Z., Chen, H. and Chan, D.C., 2013. Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular biology of the cell*, 24(5): 659-67.
- Lou, G. et al., 2020. Mitophagy and Neuroprotection. *Trends Mol Med*, 26(1): 8-20.
- Lovell, M.A., Soman, S. and Bradley, M.A., 2011. Oxidatively modified nucleic acids in preclinical Alzheimer's disease (PCAD) brain. *Mechanisms of ageing and development*, 132(8-9): 443-8.
- Lu, D.C. et al., 2000. A second cytotoxic proteolytic peptide derived from amyloid beta-protein precursor. *Nat Med*, 6(4): 397-404.
- Lu, G. et al., 2021. The effects of metformin on autophagy. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 137: 111286.
- Lu, X.Y. et al., 2020. Metformin Ameliorates A β Pathology by Insulin-Degrading Enzyme in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Oxid Med Cell Longev*, 2020: 2315106.
- Ma, T. et al., 2014. Inhibition of AMP-activated protein kinase signaling alleviates impairments in hippocampal synaptic plasticity induced by amyloid β . *J Neurosci*, 34(36): 12230-8.
- Maciejewska, K., Czarnecka, K. and Szymański, P., 2021. A review of the mechanisms underlying selected comorbidities in Alzheimer's disease. *Pharmacological reports : PR*.
- MacIver, N.J. et al., 2011. The liver kinase B1 is a central regulator of T cell development, activation, and metabolism. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 187(8): 4187-98.
- Mahley, R.W. and Huang, Y., 2012. Apolipoprotein e sets the stage: response to injury triggers neuropathology. *Neuron*, 76(5): 871-85.
- Maloney, J.A. et al., 2014. Molecular mechanisms of Alzheimer disease protection by the A673T allele of amyloid precursor protein. *J Biol Chem*, 289(45): 30990-1000.
- Mancini, S.J. et al., 2017. Activation of AMP-activated protein kinase rapidly suppresses multiple pro-inflammatory pathways in adipocytes including IL-1 receptor-associated kinase-4 phosphorylation. *Molecular and cellular endocrinology*, 440: 44-56.
- Manczak, M., Calkins, M.J. and Reddy, P.H., 2011. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer's disease: implications for neuronal damage. *Hum Mol Genet*, 20(13): 2495-509.
- Manczak, M. and Reddy, P.H., 2012. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum Mol Genet*, 21(11): 2538-47.
- Maniar, K. et al., 2017. A story of metformin-butyrate synergism to control various pathological conditions as a consequence of gut microbiome modification: Genesis of a wonder drug? *Pharmacol Res*, 117: 103-128.
- Marsin, A.S., Bouzin, C., Bertrand, L. and Hue, L., 2002. The stimulation of glycolysis by hypoxia in activated monocytes is mediated by AMP-activated protein kinase and inducible 6-phosphofructo-2-kinase. *J Biol Chem*, 277(34): 30778-83.
- Martín-Maestro, P. et al., 2017a. Mitophagy Failure in Fibroblasts and iPSC-Derived Neurons of Alzheimer's Disease-Associated Presenilin 1 Mutation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 10.
- Martín-Maestro, P. et al., 2017b. Slower Dynamics and Aged Mitochondria in Sporadic Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2017: 1-14.
- Martín-Maestro, P., Gargini, R., Perry, G., Avila, J. and García-Escudero, V., 2016. PARK2 enhancement is able to compensate mitophagy alterations found in sporadic Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 25(4): 792-806.
- Martín-Maestro, P. et al., 2019. Autophagy Induction by Bexarotene Promotes Mitophagy in Presenilin 1 Familial Alzheimer's Disease iPSC-Derived Neural Stem Cells. *Molecular Neurobiology*, 56(12): 8220-8236.
- Martinez, F.O. and Gordon, S., 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, 6: 13.

- Marttinen, M. et al., 2018. Molecular Mechanisms of Synaptotoxicity and Neuroinflammation in Alzheimer's Disease. *Frontiers in neuroscience*, 12: 963.
- Mary, A., Vaillant-Beuchot, L., Checler, F. and Chami, M., 2021. [Mitochondrial dysfunction and mitophagy failure in Alzheimer's disease]. *Medicine sciences : M/S*, 37(10): 843-847.
- Masters, C.L. et al., 2015. Alzheimer's disease. *Nature reviews. Disease primers*, 1: 15056.
- Mathur, R. et al., 2015. A reduced astrocyte response to β -amyloid plaques in the ageing brain associates with cognitive impairment. *PLoS one*, 10(2): e0118463.
- Matsui, T. et al., 2018. Autophagosomal YKT6 is required for fusion with lysosomes independently of syntaxin 17. *J Cell Biol*, 217(8): 2633-2645.
- Matsumoto, G., Shimogori, T., Hattori, N. and Nukina, N., 2015. TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet*, 24(15): 4429-42.
- Maurer, I., Zierz, S. and Möller, H.J., 2000. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. *Neurobiol Aging*, 21(3): 455-62.
- McBride, A., Ghilagaber, S., Nikolaev, A. and Hardie, D.G., 2009. The glycogen-binding domain on the AMPK beta subunit allows the kinase to act as a glycogen sensor. *Cell Metab*, 9(1): 23-34.
- McEwan, D.G. et al., 2015. PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins. *Molecular cell*, 57(1): 39-54.
- McLelland, G.L. et al., 2018. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *Elife*, 7.
- McManus, R.M., Higgins, S.C., Mills, K.H. and Lynch, M.A., 2014. Respiratory infection promotes T cell infiltration and amyloid- β deposition in APP/PS1 mice. *Neurobiol Aging*, 35(1): 109-21.
- Meares, G.P., Qin, H., Liu, Y., Holdbrooks, A.T. and Benveniste, E.N., 2013. AMP-activated protein kinase restricts IFN- γ signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 190(1): 372-80.
- Mekuria, A.N., Ayele, Y., Tola, A. and Mishore, K.M., 2019. Monotherapy with Metformin versus Sulfonylureas and Risk of Cancer in Type 2 Diabetic Patients: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of diabetes research*, 2019: 7676909.
- Mensch, M. et al., 2021. A η - α and A η - β peptides impair LTP ex vivo within the low nanomolar range and impact neuronal activity in vivo. *Alzheimers Res Ther*, 13(1): 125.
- Michalek, R.D. et al., 2011. Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4⁺ T cell subsets. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 186(6): 3299-303.
- Mihaly, S.R., Ninomiya-Tsuji, J. and Morioka, S., 2014. TAK1 control of cell death. *Cell death and differentiation*, 21(11): 1667-76.
- Mihaylova, M.M. et al., 2011. Class IIa histone deacetylases are hormone-activated regulators of FOXO and mammalian glucose homeostasis. *Cell*, 145(4): 607-21.
- Mitani, Y. et al., 2012. Differential effects between γ -secretase inhibitors and modulators on cognitive function in amyloid precursor protein-transgenic and nontransgenic mice. *J Neurosci*, 32(6): 2037-50.
- Mohammed, I., Hollenberg, M.D., Ding, H. and Triggler, C.R., 2021. A Critical Review of the Evidence That Metformin Is a Putative Anti-Aging Drug That Enhances Healthspan and Extends Lifespan. *Frontiers in endocrinology*, 12: 718942.
- Momcilovic, M., Hong, S.P. and Carlson, M., 2006. Mammalian TAK1 activates Snf1 protein kinase in yeast and phosphorylates AMP-activated protein kinase in vitro. *J Biol Chem*, 281(35): 25336-43.
- Moore, A.S. and Holzbaur, E.L., 2016. Dynamic recruitment and activation of ALS-associated TBK1 with its target optineurin are required for efficient mitophagy. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(24): E3349-58.
- Moreira, P.I. et al., 2007. Lipoic acid and N-acetyl cysteine decrease mitochondrial-related oxidative stress in Alzheimer disease patient fibroblasts. *J Alzheimers Dis*, 12(2): 195-206.
- Morley, J.E., Farr, S.A., Nguyen, A.D. and Xu, F., 2019. Editorial: What is the Physiological Function of Amyloid-Beta Protein? *The journal of nutrition, health & aging*, 23(3): 225-226.
- Morselli, E. et al., 2011. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *The Journal of Cell Biology*, 192(4): 615-629.

- Moussa, C. et al., 2017. Resveratrol regulates neuro-inflammation and induces adaptive immunity in Alzheimer's disease. *Journal of neuroinflammation*, 14(1): 1.
- Müller, U.C., Deller, T. and Korte, M., 2017. Not just amyloid: physiological functions of the amyloid precursor protein family. *Nature reviews. Neuroscience*, 18(5): 281-298.
- Munday, M.R., Campbell, D.G., Carling, D. and Hardie, D.G., 1988. Identification by amino acid sequencing of three major regulatory phosphorylation sites on rat acetyl-CoA carboxylase. *European journal of biochemistry*, 175(2): 331-8.
- Mungai, P.T. et al., 2011. Hypoxia triggers AMPK activation through reactive oxygen species-mediated activation of calcium release-activated calcium channels. *Molecular and cellular biology*, 31(17): 3531-45.
- Murakawa, T. et al., 2019. A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy. *Cell reports*, 26(2): 338-345.e6.
- Murakawa, T. et al., 2015. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun*, 6: 7527.
- Nalbantoglu, J. et al., 1997. Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature*, 387(6632): 500-5.
- Naon, D. et al., 2016. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(40): 11249-11254.
- Narkar, V.A. et al., 2008. AMPK and PPARdelta agonists are exercise mimetics. *Cell*, 134(3): 405-15.
- Neff, R.A. et al., 2021. Molecular subtyping of Alzheimer's disease using RNA sequencing data reveals novel mechanisms and targets. *Sci Adv*, 7(2).
- Neumann, D., 2018. Is TAK1 a Direct Upstream Kinase of AMPK? *Int J Mol Sci*, 19(8).
- Nhan, H.S., Chiang, K. and Koo, E.H., 2015. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol*, 129(1): 1-19.
- Niemantsverdriet, E., Valckx, S., Bjerke, M. and Engelborghs, S., 2017. Alzheimer's disease CSF biomarkers: clinical indications and rational use. *Acta neurologica Belgica*, 117(3): 591-602.
- Norkett, R., Modi, S. and Kittler, J.T., 2017. Mitochondrial roles of the psychiatric disease risk factor DISC1. *Schizophrenia research*, 187: 47-54.
- Nunomura, A. et al., 1999. Neuronal RNA oxidation in Alzheimer's disease and Down's syndrome. *Ann N Y Acad Sci*, 893: 362-4.
- O'Neill, L.A. and Hardie, D.G., 2013. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation. *Nature*, 493(7432): 346-55.
- Oakhill, J.S. et al., 2010. β -Subunit myristoylation is the gatekeeper for initiating metabolic stress sensing by AMP-activated protein kinase (AMPK). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(45): 19237-41.
- Oakhill, J.S. et al., 2011. AMPK is a direct adenylate charge-regulated protein kinase. *Science*, 332(6036): 1433-5.
- Okatsu, K. et al., 2012. Mitochondrial hexokinase HKI is a novel substrate of the Parkin ubiquitin ligase. *Biochemical and biophysical research communications*, 428(1): 197-202.
- Okatsu, K. et al., 2013. A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment. *J Biol Chem*, 288(51): 36372-84.
- Ollila, S. and Mäkelä, T.P., 2011. The tumor suppressor kinase LKB1: lessons from mouse models. *Journal of molecular cell biology*, 3(6): 330-40.
- Orr, A.L. et al., 2019. Neuronal Apolipoprotein E4 Expression Results in Proteome-Wide Alterations and Compromises Bioenergetic Capacity by Disrupting Mitochondrial Function. *J Alzheimers Dis*, 68(3): 991-1011.
- Ortiz-Sanz, C. et al., 2020. Early Effects of A β Oligomers on Dendritic Spine Dynamics and Arborization in Hippocampal Neurons. *Frontiers in synaptic neuroscience*, 12: 2.
- Oster-Granite, M.L., McPhie, D.L., Greenan, J. and Neve, R.L., 1996. Age-dependent neuronal and synaptic degeneration in mice transgenic for the C terminus of the amyloid precursor protein. *J Neurosci*, 16(21): 6732-41.
- Ou, Z. et al., 2018. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun*, 69: 351-363.
- Ovens, A.J. et al., 2021. Post-Translational Modifications of the Energy Guardian AMP-Activated Protein Kinase. *Int J Mol Sci*, 22(3).

- Pakpian, N., Phopin, K., Kitidee, K., Govitrapong, P. and Wongchitrat, P., 2020. Alterations in mitochondrial dynamic-related genes in the peripheral blood of Alzheimer's disease patients. *Current Alzheimer Research*.
- Palikaras, K., Lionaki, E. and Tavernarakis, N., 2018. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat Cell Biol*, 20(9): 1013-1022.
- Pankiv, S. et al., 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem*, 282(33): 24131-45.
- Paquette, M. et al., 2021. AMPK-dependent phosphorylation is required for transcriptional activation of TFEB and TFE3. *Autophagy*: 1-19.
- Parcon, P.A. et al., 2018. Apolipoprotein E4 inhibits autophagy gene products through direct, specific binding to CLEAR motifs. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*, 14(2): 230-242.
- Pardossi-Piquard, R. et al., 2005. Presenilin-dependent transcriptional control of the A β -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of betaAPP and APLP. *Neuron*, 46(4): 541-54.
- Park, J.M. et al., 2016. The ULK1 complex mediates MTORC1 signaling to the autophagy initiation machinery via binding and phosphorylating ATG14. *Autophagy*, 12(3): 547-64.
- Park, S.J. et al., 2021. Increased O-GlcNAcylation of Drp1 by amyloid-beta promotes mitochondrial fission and dysfunction in neuronal cells. *Molecular brain*, 14(1): 6.
- Parpura, V. et al., 2012. Glial cells in (patho)physiology. *Journal of neurochemistry*, 121(1): 4-27.
- Pavlov, P.F. et al., 2011. Mitochondrial γ -secretase participates in the metabolism of mitochondria-associated amyloid precursor protein. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 25(1): 78-88.
- Pera, M. et al., 2013. Distinct patterns of APP processing in the CNS in autosomal-dominant and sporadic Alzheimer disease. *Acta Neuropathol*, 125(2): 201-13.
- Pera, M. et al., 2017. Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *The EMBO Journal*, 36(22): 3356-3371.
- Pérez-González, R. et al., 2020. Extracellular vesicles: where the amyloid precursor protein carboxyl-terminal fragments accumulate and amyloid- β oligomerizes. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(9): 12922-12931.
- Pérez, M.J., Ponce, D.P., Aranguiz, A., Behrens, M.I. and Quintanilla, R.A., 2018. Mitochondrial permeability transition pore contributes to mitochondrial dysfunction in fibroblasts of patients with sporadic Alzheimer's disease. *Redox biology*, 19: 290-300.
- Perreault, S., Bousquet, O., Lauzon, M., Paiement, J. and Leclerc, N., 2009. Increased association between rough endoplasmic reticulum membranes and mitochondria in transgenic mice that express P301L tau. *J Neuropathol Exp Neurol*, 68(5): 503-14.
- Perrin, F. et al., 2020. Dimeric Transmembrane Orientations of APP/C99 Regulate γ -Secretase Processing Line Impacting Signaling and Oligomerization. *iScience*, 23(12): 101887.
- Peters-Libeu, C. et al., 2015. sA β PP α is a Potent Endogenous Inhibitor of BACE1. *J Alzheimers Dis*, 47(3): 545-55.
- Phelan, M.J., Ruth, A.M., Daniel, L.G. and Steven, S.S., 2017. Phase II Clinical Trial of Nicotinamide for the Treatment of Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *Journal of Geriatric Medicine and Gerontology*, 3 (1).
- Pickles, S., Vigié, P. and Youle, R.J., 2018. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Current biology : CB*, 28(4): R170-r185.
- Picone, P. et al., 2015. Metformin increases APP expression and processing via oxidative stress, mitochondrial dysfunction and NF- κ B activation: Use of insulin to attenuate metformin's effect. *Biochimica et biophysica acta*, 1853(5): 1046-59.
- Pierrot, N. et al., 2016. Targretin Improves Cognitive and Biological Markers in a Patient with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 49(2): 271-276.
- Pigino, G. et al., 2003. Alzheimer's presenilin 1 mutations impair kinesin-based axonal transport. *J Neurosci*, 23(11): 4499-508.

- Pilipenko, V. et al., 2020. Neuroprotective potential of antihyperglycemic drug metformin in streptozocin-induced rat model of sporadic Alzheimer's disease. *European journal of pharmacology*, 881: 173290.
- Pinnix, I., Ghiso, J.A., Pappolla, M.A. and Sambamurti, K., 2013. Major carboxyl terminal fragments generated by γ -secretase processing of the Alzheimer amyloid precursor are 50 and 51 amino acids long. *The American journal of geriatric psychiatry : official journal of the American Association for Geriatric Psychiatry*, 21(5): 474-83.
- Pocivavsek, A., Burns, M.P. and Rebeck, G.W., 2009. Low-density lipoprotein receptors regulate microglial inflammation through c-Jun N-terminal kinase. *Glia*, 57(4): 444-53.
- Polekhina, G. et al., 2003. AMPK beta subunit targets metabolic stress sensing to glycogen. *Current biology : CB*, 13(10): 867-71.
- Porquet, D. et al., 2013. Dietary resveratrol prevents Alzheimer's markers and increases life span in SAMP8. *Age (Dordrecht, Netherlands)*, 35(5): 1851-65.
- Porquet, D. et al., 2014. Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 42(4): 1209-1220.
- Prince, M. et al., 2013. The global prevalence of dementia: a systematic review and metaanalysis. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 9(1): 63-75.e2.
- Puente, C., Hendrickson, R.C. and Jiang, X., 2016. Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem*, 291(11): 6026-6035.
- Pulina, M.V., Hopkins, M., Haroutunian, V., Greengard, P. and Bustos, V., 2020. C99 selectively accumulates in vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association*, 16(2): 273-282.
- Qi, Y., Qiu, Q., Gu, X., Tian, Y. and Zhang, Y., 2016. ATM mediates spermidine-induced mitophagy via PINK1 and Parkin regulation in human fibroblasts. *Scientific Reports*, 6(1): 24700.
- Qin, W. et al., 2009. PGC-1 α expression decreases in the Alzheimer disease brain as a function of dementia. *Archives of neurology*, 66(3): 352-61.
- Qiu, C., Kivipelto, M. and von Strauss, E., 2009. Epidemiology of Alzheimer's disease: occurrence, determinants, and strategies toward intervention. *Dialogues in clinical neuroscience*, 11(2): 111-28.
- Qiu, W.Q. et al., 1998. Insulin-degrading enzyme regulates extracellular levels of amyloid beta-protein by degradation. *J Biol Chem*, 273(49): 32730-8.
- Quintanilla, R.A., Matthews-Roberson, T.A., Dolan, P.J. and Johnson, G.V., 2009. Caspase-cleaved tau expression induces mitochondrial dysfunction in immortalized cortical neurons: implications for the pathogenesis of Alzheimer disease. *J Biol Chem*, 284(28): 18754-66.
- Quintanilla, R.A., Tapia-Monsalves, C., Vergara, E.H., Pérez, M.J. and Aranguiz, A., 2020. Truncated Tau Induces Mitochondrial Transport Failure Through the Impairment of TRAK2 Protein and Bioenergetics Decline in Neuronal Cells. *Frontiers in cellular neuroscience*, 14: 175.
- Rahman, A. et al., 2020. Sex-driven modifiers of Alzheimer risk: A multimodality brain imaging study. *Neurology*, 95(2): e166-e178.
- Rajamohan, F. et al., 2016. Probing the enzyme kinetics, allosteric modulation and activation of α 1- and α 2-subunit-containing AMP-activated protein kinase (AMPK) heterotrimeric complexes by pharmacological and physiological activators. *Biochem J*, 473(5): 581-92.
- Ramamurthy, S. and Ronnett, G.V., 2006. Developing a head for energy sensing: AMP-activated protein kinase as a multifunctional metabolic sensor in the brain. *The Journal of physiology*, 574(Pt 1): 85-93.
- Rao, M., Gao, C., Guo, M., Law, B.Y.K. and Xu, Y., 2018. Effects of metformin treatment on radiotherapy efficacy in patients with cancer and diabetes: a systematic review and meta-analysis. *Cancer management and research*, 10: 4881-4890.
- Rasmussen, M.K., Mestre, H. and Nedergaard, M., 2018. The glymphatic pathway in neurological disorders. *The Lancet. Neurology*, 17(11): 1016-1024.
- Rasool, S. et al., 2018. PINK1 autophosphorylation is required for ubiquitin recognition. *EMBO Rep*, 19(4).
- Rege, S.D., Geetha, T., Griffin, G.D., Broderick, T.L. and Babu, J.R., 2014. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience*, 6.

- Reichenbach, N. et al., 2019. Inhibition of Stat3-mediated astrogliosis ameliorates pathology in an Alzheimer's disease model. *EMBO molecular medicine*, 11(2).
- Reza-Zaldivar, E.E. et al., 2020. Dendritic Spine and Synaptic Plasticity in Alzheimer's Disease: A Focus on MicroRNA. *Front Cell Dev Biol*, 8: 255.
- Rice, H.C. et al., 2019. Secreted amyloid- β precursor protein functions as a GABA(B)R1a ligand to modulate synaptic transmission. *Science*, 363(6423).
- Richter, B. et al., 2016. Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 113(15): 4039-44.
- Ries, M. and Sastre, M., 2016. Mechanisms of A β Clearance and Degradation by Glial Cells. *Front Aging Neurosci*, 8: 160.
- Roca-Agujetas, V. et al., 2021. Cholesterol alters mitophagy by impairing optineurin recruitment and lysosomal clearance in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*, 16(1): 15.
- Rogov, V.V. et al., 2017. Phosphorylation of the mitochondrial autophagy receptor Nix enhances its interaction with LC3 proteins. *Sci Rep*, 7(1): 1131.
- Ross, F.A., MacKintosh, C. and Hardie, D.G., 2016. AMP-activated protein kinase: a cellular energy sensor that comes in 12 flavours. *The FEBS journal*, 283(16): 2987-3001.
- Rossi, M.J. and Pekkurnaz, G., 2019. Powerhouse of the mind: mitochondrial plasticity at the synapse. *Current opinion in neurobiology*, 57: 149-155.
- Rovelet-Lecrux, A. et al., 2006. APP locus duplication causes autosomal dominant early-onset Alzheimer disease with cerebral amyloid angiopathy. *Nature genetics*, 38(1): 24-6.
- Ruderman, N.B., Saha, A.K. and Kraegen, E.W., 2003. Minireview: malonyl CoA, AMP-activated protein kinase, and adiposity. *Endocrinology*, 144(12): 5166-71.
- Rui, Y., Tiwari, P., Xie, Z. and Zheng, J.Q., 2006. Acute impairment of mitochondrial trafficking by beta-amyloid peptides in hippocampal neurons. *J Neurosci*, 26(41): 10480-7.
- Rush, T. et al., 2018. Synaptotoxicity in Alzheimer's Disease Involved a Dysregulation of Actin Cytoskeleton Dynamics through Cofilin 1 Phosphorylation. *J Neurosci*, 38(48): 10349-10361.
- Russell, R.C. et al., 2013. ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol*, 15(7): 741-50.
- Rutherford, C. et al., 2016. Phosphorylation of Janus kinase 1 (JAK1) by AMP-activated protein kinase (AMPK) links energy sensing to anti-inflammatory signaling. *Science signaling*, 9(453): ra109.
- Ryu, D. et al., 2016. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nature Medicine*, 22(8): 879-888.
- Ryu, W.I. et al., 2021. Brain cells derived from Alzheimer's disease patients have multiple specific innate abnormalities in energy metabolism. *Molecular psychiatry*.
- Saffari, P.M. et al., 2020. Metformin loaded phosphatidylserine nanoliposomes improve memory deficit and reduce neuroinflammation in streptozotocin-induced Alzheimer's disease model. *Life Sci*, 255: 117861.
- Safiulina, D. et al., 2019. Miro proteins prime mitochondria for Parkin translocation and mitophagy. *Embo j*, 38(2).
- Sag, D., Carling, D., Stout, R.D. and Suttles, J., 2008. Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase promotes macrophage polarization to an anti-inflammatory functional phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 181(12): 8633-41.
- Saleeb, R.S., Kavanagh, D.M., Dun, A.R., Dalgarno, P.A. and Duncan, R.R., 2019. A VPS33A-binding motif on syntaxin 17 controls autophagy completion in mammalian cells. *J Biol Chem*, 294(11): 4188-4201.
- Sandoval, H. et al., 2008. Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature*, 454(7201): 232-5.
- Sanz-Blasco, S., Valero, R.A., Rodríguez-Crespo, I., Villalobos, C. and Núñez, L., 2008. Mitochondrial Ca²⁺ overload underlies Abeta oligomers neurotoxicity providing an unexpected mechanism of neuroprotection by NSAIDs. *PloS one*, 3(7): e2718.
- Sayas, C.L., 2020. Tau-based therapies for Alzheimer's disease: Promising novel neuroprotective approaches, *Neuroprotection in Autism, Schizophrenia and Alzheimer's Disease*. Elsevier, pp. 245-272.

- Schmukler, E. et al., 2020. Altered mitochondrial dynamics and function in APOE4-expressing astrocytes. *Cell Death & Disease*, 11(7).
- Schönherr, C. et al., 2016. Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid β peptides by meprin β depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol Neurodegener*, 11: 19.
- Scott, J.W. et al., 2015. Inhibition of AMP-Activated Protein Kinase at the Allosteric Drug-Binding Site Promotes Islet Insulin Release. *Chemistry & biology*, 22(6): 705-11.
- Selkoe, D.J. and Hardy, J., 2016. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease at 25 years. *EMBO molecular medicine*, 8(6): 595-608.
- Sengupta, A. et al., 1998. Phosphorylation of tau at both Thr 231 and Ser 262 is required for maximal inhibition of its binding to microtubules. *Archives of biochemistry and biophysics*, 357(2): 299-309.
- Settembre, C. et al., 2013. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat Cell Biol*, 15(6): 647-58.
- Shan, T., Zhang, P., Bi, P. and Kuang, S., 2015. Lkb1 deletion promotes ectopic lipid accumulation in muscle progenitor cells and mature muscles. *Journal of cellular physiology*, 230(5): 1033-41.
- Shao, C. et al., 2008. Altered 8-oxoguanine glycosylase in mild cognitive impairment and late-stage Alzheimer's disease brain. *Free radical biology & medicine*, 45(6): 813-9.
- Sheng, B. et al., 2012. Impaired mitochondrial biogenesis contributes to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 120(3): 419-29.
- Shi, R.Y. et al., 2014. BNIP3 interacting with LC3 triggers excessive mitophagy in delayed neuronal death in stroke. *CNS Neurosci Ther*, 20(12): 1045-55.
- Shukla, D. et al., 2021. Hippocampal Glutathione Depletion and pH Increment in Alzheimer's Disease: An in vivo MRS Study. *J Alzheimers Dis*.
- Siegel, G. et al., 2017. The Alzheimer's Disease γ -Secretase Generates Higher 42:40 Ratios for β -Amyloid Than for p3 Peptides. *Cell reports*, 19(10): 1967-1976.
- Simard, A.R., Soulet, D., Gowing, G., Julien, J.P. and Rivest, S., 2006. Bone marrow-derived microglia play a critical role in restricting senile plaque formation in Alzheimer's disease. *Neuron*, 49(4): 489-502.
- Simonovitch, S., Schmukler, E., Masliah, E., Pinkas-Kramarski, R. and Michaelson, D.M., 2019. The Effects of APOE4 on Mitochondrial Dynamics and Proteins in vivo. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*, 70(3): 861-875.
- Simpson, J.E. et al., 2010. Population variation in oxidative stress and astrocyte DNA damage in relation to Alzheimer-type pathology in the ageing brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, 36(1): 25-40.
- Sinha, R.A. et al., 2015. Thyroid hormone induction of mitochondrial activity is coupled to mitophagy via ROS-AMPK-ULK1 signaling. *Autophagy*, 11(8): 1341-57.
- Sirk, D. et al., 2007. Chronic exposure to sub-lethal beta-amyloid (A β) inhibits the import of nuclear-encoded proteins to mitochondria in differentiated PC12 cells. *Journal of neurochemistry*, 103(5): 1989-2003.
- Sobue, A. et al., 2021. Microglial gene signature reveals loss of homeostatic microglia associated with neurodegeneration of Alzheimer's disease. *Acta neuropathologica communications*, 9(1): 1.
- Sofola-Adesakin, O., Khericha, M., Snoeren, I., Tsuda, L. and Partridge, L., 2016. pGluA β increases accumulation of A β in vivo and exacerbates its toxicity. *Acta neuropathologica communications*, 4(1): 109.
- Sohn, H.Y. et al., 2021. ApoE4 attenuates autophagy via FoxO3a repression in the brain. *Sci Rep*, 11(1): 17604.
- Sohn, P.D. et al., 2016. Acetylated tau destabilizes the cytoskeleton in the axon initial segment and is mislocalized to the somatodendritic compartment. *Mol Neurodegener*, 11(1): 47.
- Son, S.M. et al., 2016. Metformin Facilitates Amyloid- β Generation by β - and γ -Secretases via Autophagy Activation. *J Alzheimers Dis*, 51(4): 1197-208.
- Song, J.X. et al., 2020a. A small molecule transcription factor EB activator ameliorates beta-amyloid precursor protein and Tau pathology in Alzheimer's disease models. *Aging Cell*, 19(2): e13069.

- Song, Y.J. et al., 2020b. The Effect of Estrogen Replacement Therapy on Alzheimer's Disease and Parkinson's Disease in Postmenopausal Women: A Meta-Analysis. *Frontiers in neuroscience*, 14: 157.
- Sorrentino, V. et al., 2017. Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature*, 552(7684): 187-193.
- Sowter, H.M., Ratcliffe, P.J., Watson, P., Greenberg, A.H. and Harris, A.L., 2001. HIF-1-dependent regulation of hypoxic induction of the cell death factors BNIP3 and NIX in human tumors. *Cancer research*, 61(18): 6669-73.
- Stapleton, D. et al., 1996. Mammalian AMP-activated protein kinase subfamily. *J Biol Chem*, 271(2): 611-4.
- Stokin, G.B. and Goldstein, L.S., 2006. Axonal transport and Alzheimer's disease. *Annual review of biochemistry*, 75: 607-27.
- Strappazzon, F. et al., 2015. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell death and differentiation*, 22(3): 517.
- Sullivan, J.E. et al., 1994. Inhibition of lipolysis and lipogenesis in isolated rat adipocytes with AICAR, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *FEBS letters*, 353(1): 33-6.
- Sun, J. et al., 2019. CRISPR/Cas9 editing of APP C-terminus attenuates β -cleavage and promotes α -cleavage. *Nat Commun*, 10(1): 53.
- Suzuki, A. et al., 2007. Leptin stimulates fatty acid oxidation and peroxisome proliferator-activated receptor alpha gene expression in mouse C2C12 myoblasts by changing the subcellular localization of the alpha2 form of AMP-activated protein kinase. *Molecular and cellular biology*, 27(12): 4317-27.
- Suzuki, T. et al., 2013. Inhibition of AMPK catabolic action by GSK3. *Molecular cell*, 50(3): 407-19.
- Swerdlow, R.H. and Khan, S.M., 2004. A "mitochondrial cascade hypothesis" for sporadic Alzheimer's disease. *Medical hypotheses*, 63(1): 8-20.
- Szargel, R. et al., 2016. The PINK1, synphilin-1 and SIAH-1 complex constitutes a novel mitophagy pathway. *Hum Mol Genet*, 25(16): 3476-3490.
- Takahashi, K., Niidome, T., Akaike, A., Kihara, T. and Sugimoto, H., 2009. Amyloid precursor protein promotes endoplasmic reticulum stress-induced cell death via C/EBP homologous protein-mediated pathway. *Journal of neurochemistry*, 109(5): 1324-37.
- Takasugi, N. et al., 2018. TMEM30A is a candidate interacting partner for the β -carboxyl-terminal fragment of amyloid- β precursor protein in endosomes. *PloS one*, 13(8): e0200988.
- Tambini, M.D. et al., 2016. ApoE4 upregulates the activity of mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep*, 17(1): 27-36.
- Tammineni, P., Ye, X., Feng, T., Aikal, D. and Cai, Q., 2017. Impaired retrograde transport of axonal autophagosomes contributes to autophagic stress in Alzheimer's disease neurons. *eLife*, 6.
- Tang, Q. et al., 2017. Trehalose ameliorates oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress via selective autophagy stimulation and autophagic flux restoration in osteoarthritis development. *Cell Death & Disease*, 8(10): e3081-e3081.
- Taylor, H., Fraser, T., Miners, J.S., Kehoe, P.G. and Love, S., 2010. Oxidative balance in Alzheimer's disease: relationship to APOE, Braak tangle stage, and the concentrations of soluble and insoluble amyloid- β . *J Alzheimers Dis*, 22(4): 1363-73.
- Thal, D.R., 2012. The role of astrocytes in amyloid β -protein toxicity and clearance. *Exp Neurol*, 236(1): 1-5.
- Thinakaran, G. and Koo, E.H., 2008. Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem*, 283(44): 29615-9.
- Thornton, C., Bright, N.J., Sastre, M., Muckett, P.J. and Carling, D., 2011. AMP-activated protein kinase (AMPK) is a tau kinase, activated in response to amyloid β -peptide exposure. *Biochem J*, 434(3): 503-12.
- Thornton, C., Snowden, M.A. and Carling, D., 1998. Identification of a novel AMP-activated protein kinase beta subunit isoform that is highly expressed in skeletal muscle. *J Biol Chem*, 273(20): 12443-50.
- Tian, W. et al., 2015. Phosphorylation of ULK1 by AMPK regulates translocation of ULK1 to mitochondria and mitophagy. *FEBS letters*, 589(15): 1847-54.

- Tijms, B.M. et al., 2020. Pathophysiological subtypes of Alzheimer's disease based on cerebrospinal fluid proteomics. *Brain*, 143(12): 3776-3792.
- Togo, T. et al., 2002. Occurrence of T cells in the brain of Alzheimer's disease and other neurological diseases. *Journal of neuroimmunology*, 124(1-2): 83-92.
- Toth, R.P. and Atkin, J.D., 2018. Dysfunction of Optineurin in Amyotrophic Lateral Sclerosis and Glaucoma. *Frontiers in immunology*, 9: 1017.
- Toyama, E.Q. et al., 2016. Metabolism. AMP-activated protein kinase mediates mitochondrial fission in response to energy stress. *Science*, 351(6270): 275-281.
- Turner, R.S. et al., 2015. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol for Alzheimer disease. *Neurology*, 85(16): 1383-91.
- Vaillant-Beuchot, L. et al., 2020. Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains. *Acta Neuropathologica*.
- van der Lee, S.J. et al., 2019. A nonsynonymous mutation in PLCG2 reduces the risk of Alzheimer's disease, dementia with Lewy bodies and frontotemporal dementia, and increases the likelihood of longevity. *Acta Neuropathol*, 138(2): 237-250.
- van Vliet, A.R. and Agostinis, P., 2018. Mitochondria-Associated Membranes and ER Stress. *Current topics in microbiology and immunology*, 414: 73-102.
- Vargas, J.N.S. et al., 2019. Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. *Molecular cell*, 74(2): 347-362.e6.
- Veeresh, P. et al., 2019. Endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk: from junction to function across neurological disorders. *Ann N Y Acad Sci*, 1457(1): 41-60.
- Venugopal, C., Pappolla, M.A. and Sambamurti, K., 2007. Insulysin cleaves the APP cytoplasmic fragment at multiple sites. *Neurochem Res*, 32(12): 2225-34.
- Villa, E. et al., 2017. Parkin-Independent Mitophagy Controls Chemotherapeutic Response in Cancer Cells. *Cell reports*, 20(12): 2846-2859.
- Vingtdeux, V., Davies, P., Dickson, D.W. and Marambaud, P., 2011. AMPK is abnormally activated in tangle- and pre-tangle-bearing neurons in Alzheimer's disease and other tauopathies. *Acta Neuropathol*, 121(3): 337-49.
- Vingtdeux, V. et al., 2010. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism. *J Biol Chem*, 285(12): 9100-13.
- Vingtdeux, V. et al., 2007. Intracellular pH regulates amyloid precursor protein intracellular domain accumulation. *Neurobiol Dis*, 25(3): 686-96.
- Višnjić, D., Lalić, H., Dembitz, V., Tomić, B. and Smoljo, T., 2021. AICAr, a Widely Used AMPK Activator with Important AMPK-Independent Effects: A Systematic Review. *Cells*, 10(5).
- Vogel, J.W. et al., 2021. Four distinct trajectories of tau deposition identified in Alzheimer's disease. *Nat Med*, 27(5): 871-881.
- Vogt, J., Traynor, R. and Sapkota, G.P., 2011. The specificities of small molecule inhibitors of the TGFβ and BMP pathways. *Cellular signalling*, 23(11): 1831-42.
- von Rotz, R.C. et al., 2004. The APP intracellular domain forms nuclear multiprotein complexes and regulates the transcription of its own precursor. *Journal of cell science*, 117(Pt 19): 4435-48.
- Voss, M. et al., 2011. Ppm1E is an in cellulo AMP-activated protein kinase phosphatase. *Cellular signalling*, 23(1): 114-24.
- Walsh, D.M. et al., 2007. The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochemical Society transactions*, 35(Pt 2): 416-20.
- Walsh, S., Merrick, R., Milne, R. and Brayne, C., 2021. Aducanumab for Alzheimer's disease? *BMJ (Clinical research ed.)*, 374: n1682.
- Walter, L. and Hajnóczky, G., 2005. Mitochondria and endoplasmic reticulum: the lethal interorganelle cross-talk. *Journal of bioenergetics and biomembranes*, 37(3): 191-206.
- Wang, B., Wang, X.B., Chen, L.Y., Huang, L. and Dong, R.Z., 2013. Belinostat-induced apoptosis and growth inhibition in pancreatic cancer cells involve activation of TAK1-AMPK signaling axis. *Biochemical and biophysical research communications*, 437(1): 1-6.
- Wang, C. and Youle, R.J., 2009. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annual review of genetics*, 43: 95-118.

- Wang, H., Jiang, T., Li, W., Gao, N. and Zhang, T., 2018a. Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Toxicology Letters*, 282: 100-108.
- Wang, H. et al., 2020a. Parkin overexpression attenuates A β -induced mitochondrial dysfunction in HEK293 cells by restoring impaired mitophagy. *Life Sciences*, 244: 117322.
- Wang, J., Markesbery, W.R. and Lovell, M.A., 2006. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in mild cognitive impairment. *Journal of neurochemistry*, 96(3): 825-32.
- Wang, J., Xiong, S., Xie, C., Markesbery, W.R. and Lovell, M.A., 2005. Increased oxidative damage in nuclear and mitochondrial DNA in Alzheimer's disease. *Journal of neurochemistry*, 93(4): 953-62.
- Wang, L. et al., 2020b. Upregulation of AMPK Ameliorates Alzheimer's Disease-Like Tau Pathology and Memory Impairment. *Mol Neurobiol*, 57(8): 3349-3361.
- Wang, L. et al., 2018b. Deletion of Type-2 Cannabinoid Receptor Induces Alzheimer's Disease-Like Tau Pathology and Memory Impairment Through AMPK/GSK3 β Pathway. *Mol Neurobiol*, 55(6): 4731-4744.
- Wang, N., Wang, H., Li, L., Li, Y. and Zhang, R., 2020c. β -Asarone Inhibits Amyloid- β by Promoting Autophagy in a Cell Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology*, 10.
- Wang, S. et al., 2010. Expression and functional profiling of neprilysin, insulin-degrading enzyme, and endothelin-converting enzyme in prospectively studied elderly and Alzheimer's brain. *Journal of neurochemistry*, 115(1): 47-57.
- Wang, X., Su, B., Fujioka, H. and Zhu, X., 2008a. Dynamin-like protein 1 reduction underlies mitochondrial morphology and distribution abnormalities in fibroblasts from sporadic Alzheimer's disease patients. *The American journal of pathology*, 173(2): 470-82.
- Wang, X. et al., 2009. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 29(28): 9090-103.
- Wang, X. et al., 2008b. Amyloid-beta overproduction causes abnormal mitochondrial dynamics via differential modulation of mitochondrial fission/fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(49): 19318-23.
- Wang, Y.Q., Qu, D.H. and Wang, K., 2016a. Therapeutic approaches to Alzheimer's disease through stimulating of non-amyloidogenic processing of amyloid precursor protein. *European review for medical and pharmacological sciences*, 20(11): 2389-403.
- Wang, Z.-T. et al., 2019. Disrupted-in-schizophrenia-1 protects synaptic plasticity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease as a mitophagy receptor. *Aging Cell*, 18(1): e12860.
- Wang, Z. et al., 2016b. The Vici Syndrome Protein EPG5 Is a Rab7 Effector that Determines the Fusion Specificity of Autophagosomes with Late Endosomes/Lysosomes. *Molecular cell*, 63(5): 781-95.
- Watzlawik, J.O. et al., 2020. Sensitive ELISA-based detection method for the mitophagy marker p-S65-Ub in human cells, autopsy brain, and blood samples. *Autophagy*: 1-16.
- Wei, L., Laurence, A. and O'Shea, J.J., 2008. New insights into the roles of Stat5a/b and Stat3 in T cell development and differentiation. *Seminars in cell & developmental biology*, 19(4): 394-400.
- Wei, Y., Chiang, W.C., Sumpter, R., Jr., Mishra, P. and Levine, B., 2017. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell*, 168(1-2): 224-238.e10.
- Wiedemann, N. and Pfanner, N., 2017. Mitochondrial Machineries for Protein Import and Assembly. *Annual review of biochemistry*, 86: 685-714.
- Wilkins, H.M. and Swerdlow, R.H., 2017. Amyloid precursor protein processing and bioenergetics. *Brain research bulletin*, 133: 71-79.
- Willem, M. et al., 2015. η -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature*, 526(7573): 443-7.
- Willows, R., Navaratnam, N., Lima, A., Read, J. and Carling, D., 2017. Effect of different γ -subunit isoforms on the regulation of AMPK. *Biochem J*, 474(10): 1741-1754.
- Wirth, M. et al., 2018. The effect of spermidine on memory performance in older adults at risk for dementia: A randomized controlled trial. *Cortex*, 109: 181-188.
- Wojsiat, J., Prandelli, C., Laskowska-Kaszub, K., Martín-Requero, A. and Wojda, U., 2015. Oxidative Stress and Aberrant Cell Cycle in Alzheimer's Disease Lymphocytes: Diagnostic Prospects. *J Alzheimers Dis*, 46(2): 329-50.

- Wojtaszewski, J.F. et al., 2003. Regulation of 5'AMP-activated protein kinase activity and substrate utilization in exercising human skeletal muscle. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism*, 284(4): E813-22.
- Woods, A. et al., 2005. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab*, 2(1): 21-33.
- Wu, N. et al., 2013. AMPK-dependent degradation of TXNIP upon energy stress leads to enhanced glucose uptake via GLUT1. *Molecular cell*, 49(6): 1167-75.
- Xiang, X. et al., 2021. Microglial activation states drive glucose uptake and FDG-PET alterations in neurodegenerative diseases. *Science translational medicine*, 13(615): eabe5640.
- Xiao, B. et al., 2007. Structural basis for AMP binding to mammalian AMP-activated protein kinase. *Nature*, 449(7161): 496-500.
- Xiao, B. et al., 2013. Structural basis of AMPK regulation by small molecule activators. *Nat Commun*, 4: 3017.
- Xiao, Q. et al., 2015. Neuronal-Targeted TFEB Accelerates Lysosomal Degradation of APP, Reducing A β Generation and Amyloid Plaque Pathogenesis. *J Neurosci*, 35(35): 12137-51.
- Xu, L.L. et al., 2017. Mitochondrial dynamics changes with age in an APPsw/PS1dE9 mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroreport*, 28(4): 222-228.
- Xu, X., 2009. Gamma-secretase catalyzes sequential cleavages of the AbetaPP transmembrane domain. *J Alzheimers Dis*, 16(2): 211-24.
- Xu, X. et al., 2021. Metformin activates chaperone-mediated autophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer disease mouse model. *Protein & cell*, 12(10): 769-787.
- Xu, Y. et al., 2015. Telmisartan prevention of LPS-induced microglia activation involves M2 microglia polarization via CaMKK β -dependent AMPK activation. *Brain Behav Immun*, 50: 298-313.
- Yamada, E. et al., 2016. Fyn phosphorylates AMPK to inhibit AMPK activity and AMP-dependent activation of autophagy. *Oncotarget*, 7(46): 74612-74629.
- Yamano, K. and Youle, R.J., 2013. PINK1 is degraded through the N-end rule pathway. *Autophagy*, 9(11): 1758-69.
- Yan, C. et al., 2020. PHB2 (prohibitin 2) promotes PINK1-PRKN/Parkin-dependent mitophagy by the PARL-PGAM5-PINK1 axis. *Autophagy*, 16(3): 419-434.
- Yan, X. et al., 2017. Ginsenoside Rd promotes non-amyloidogenic pathway of amyloid precursor protein processing by regulating phosphorylation of estrogen receptor alpha. *Life Sci*, 168: 16-23.
- Yang, C. et al., 2017. NRBF2 is involved in the autophagic degradation process of APP-CTFs in Alzheimer disease models. *Autophagy*, 13(12): 2028-2040.
- Yang, M. et al., 2020a. Mitochondria-Associated ER Membranes - The Origin Site of Autophagy. *Front Cell Dev Biol*, 8: 595.
- Yang, W. et al., 2001. Regulation of transcription by AMP-activated protein kinase: phosphorylation of p300 blocks its interaction with nuclear receptors. *J Biol Chem*, 276(42): 38341-4.
- Yang, X. et al., 2020b. Spermidine inhibits neurodegeneration and delays aging via the PINK1-PDR1-dependent mitophagy pathway in *C. elegans*. *Aging*, 12(17): 16852-16866.
- Yang, Z., Kahn, B.B., Shi, H. and Xue, B.Z., 2010. Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1. *J Biol Chem*, 285(25): 19051-9.
- Yao, Y. et al., 2021. A delta-secretase-truncated APP fragment activates CEBPB, mediating Alzheimer's disease pathologies. *Brain*, 144(6): 1833-1852.
- Yatin, S.M., Varadarajan, S. and Butterfield, D.A., 2000. Vitamin E Prevents Alzheimer's Amyloid beta-Peptide (1-42)-Induced Neuronal Protein Oxidation and Reactive Oxygen Species Production. *J Alzheimers Dis*, 2(2): 123-131.
- Ye, X., Sun, X., Starovoytov, V. and Cai, Q., 2015. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Hum Mol Genet*, 24(10): 2938-51.
- Yoo, S.M. et al., 2020. FKBP8 LIRL-dependent mitochondrial fragmentation facilitates mitophagy under stress conditions. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 34(2): 2944-2957.
- Yuan, Y. et al., 2017. BNIP3L/NIX-mediated mitophagy protects against ischemic brain injury independent of PARK2. *Autophagy*, 13(10): 1754-1766.

- Zhang, C.S. et al., 2017a. Fructose-1,6-bisphosphate and aldolase mediate glucose sensing by AMPK. *Nature*, 548(7665): 112-116.
- Zhang, C.S. et al., 2016. Metformin Activates AMPK through the Lysosomal Pathway. *Cell Metab*, 24(4): 521-522.
- Zhang, H. et al., 2008. Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia. *J Biol Chem*, 283(16): 10892-903.
- Zhang, L. and Chen, J., 2018. Biological Effects of Tetrahydroxystilbene Glucoside: An Active Component of a Rhizome Extracted from *Polygonum multiflorum*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2018.
- Zhang, L. et al., 2021. miR-204 silencing reduces mitochondrial autophagy and ROS production in a murine AD model via the TRPML1-activated STAT3 pathway. *Mol Ther Nucleic Acids*, 24: 822-831.
- Zhang, S. et al., 2017b. BACE1 Cleavage Site Selection Critical for Amyloidogenesis and Alzheimer's Pathogenesis. *J Neurosci*, 37(29): 6915-6925.
- Zhang, Y., Qiu, J., Wang, X., Zhang, Y. and Xia, M., 2011. AMP-activated protein kinase suppresses endothelial cell inflammation through phosphorylation of transcriptional coactivator p300. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 31(12): 2897-908.
- Zhang, Z. et al., 2015. Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun*, 6: 8762.
- Zhao, P. et al., 2018. TBK1 at the Crossroads of Inflammation and Energy Homeostasis in Adipose Tissue. *Cell*, 172(4): 731-743.e12.
- Zhou, C. et al., 2017. Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell research*, 27(2): 184-201.
- Zhou, G. et al., 2001. Role of AMP-activated protein kinase in mechanism of metformin action. *J Clin Invest*, 108(8): 1167-74.
- Zhu, C.W. et al., 2018. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial of resveratrol with glucose and malate (RGM) to slow the progression of Alzheimer's disease: A pilot study. *Alzheimer's & dementia (New York, N. Y.)*, 4: 609-616.
- Zhu, L. et al., 2020. Activation of TFEB-mediated autophagy by trehalose attenuates mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced acute kidney injury. *Theranostics*, 10(13): 5829-5844.
- Zhu, Y. et al., 2013. Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J Biol Chem*, 288(2): 1099-113.

Annexe 1

Revue : Dysfonction mitochondriale et défaillance de la mitophagie dans la maladie d'Alzheimer.

Arnaud Mary*, Loan Vaillant-Beuchot*, Frédéric Checler, Mounia Chami.

(* contribution égale)

Médecine/sciences

2021 Oct;37(10):843-847. doi: 10.1051/medsci/2021133.

<https://doi.org/10.1051/medsci/2021133>

- *Cette revue en français rapporte les résultats de l'article 1 (Vaillant-Beuchot et al., 2020) et les résumés à l'attention d'un large public.*



NOUVELLE

Dysfonction mitochondriale et défaillance de la mitophagie dans la maladie d'Alzheimer

Arnaud Mary*, Loan Vaillant-Beuchot*, Frédéric Checler, Mounia Chami

Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, Institut de pharmacologie moléculaire et cellulaire, Laboratoire d'excellence DistALZ, 660 route des Lucioles, 06560 Sophia-Antipolis, Valbonne, France.

*Contribution égale
mchami@ipmc.cnrs.fr

> La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. En l'absence de thérapie efficace, cette maladie, dont l'incidence ne cesse d'augmenter, représente un défi scientifique, économique, et sociétal. L'un de ses principaux symptômes est la perte de la mémoire, qui se développe sur plusieurs dizaines d'années, associée à une défaillance fonctionnelle de neurones situés dans des zones spécifiques du cerveau régissant les fonctions d'apprentissage et de mémorisation, notamment l'hippocampe. Les analyses *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, et des modèles murins de la maladie, ont conduit à définir cette maladie comme une « protéinopathie » qui se caractérise par

l'accumulation dans les cellules et dans le milieu extracellulaire (s'agrégeant dans des plaques séniles) du peptide amyloïde β ($A\beta$), et par une phosphorylation anormale de la protéine Tau (pTau), conduisant à la dégénérescence neurofibrillaire (*neurofibrillary tangles*, NFT) des neurones [1]. Le peptide $A\beta$ est produit par clivages successifs de la protéine précurseur du peptide amyloïde (*amyloid protein precursor*, APP) par les enzymes β - et γ -sécrétases, dans la voie amyloïdogène (Figure 1). L'apparition des formes familiales précoces et agressives de la maladie d'Alzheimer, favorisées par des mutations dans les gènes codant l'APP et les présénilines 1 et 2 (PS1/2, composants du complexe γ -sécrétase), a conduit à proposer que la voie amyloïdogène jouait un rôle

majeur dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Néanmoins, l'échec des traitements ciblant uniquement l' $A\beta$ indique que d'autres fragments issus du clivage de l'APP pourraient contribuer aux dysfonctionnements cellulaires impliqués dans le développement de la maladie d'Alzheimer. Le rôle pathogène des fragments C-terminaux de l'APP (APP-CTF : C99 et C83) (Figure 1) a ainsi été récemment souligné dans différentes études [2].

Les dysfonctions mitochondriales dans la maladie d'Alzheimer

Les mitochondries sont des organelles intracellulaires dont la fonction principale est de produire de l'énergie sous la forme d'ATP. Dans les neurones, l'ATP est nécessaire notamment à la

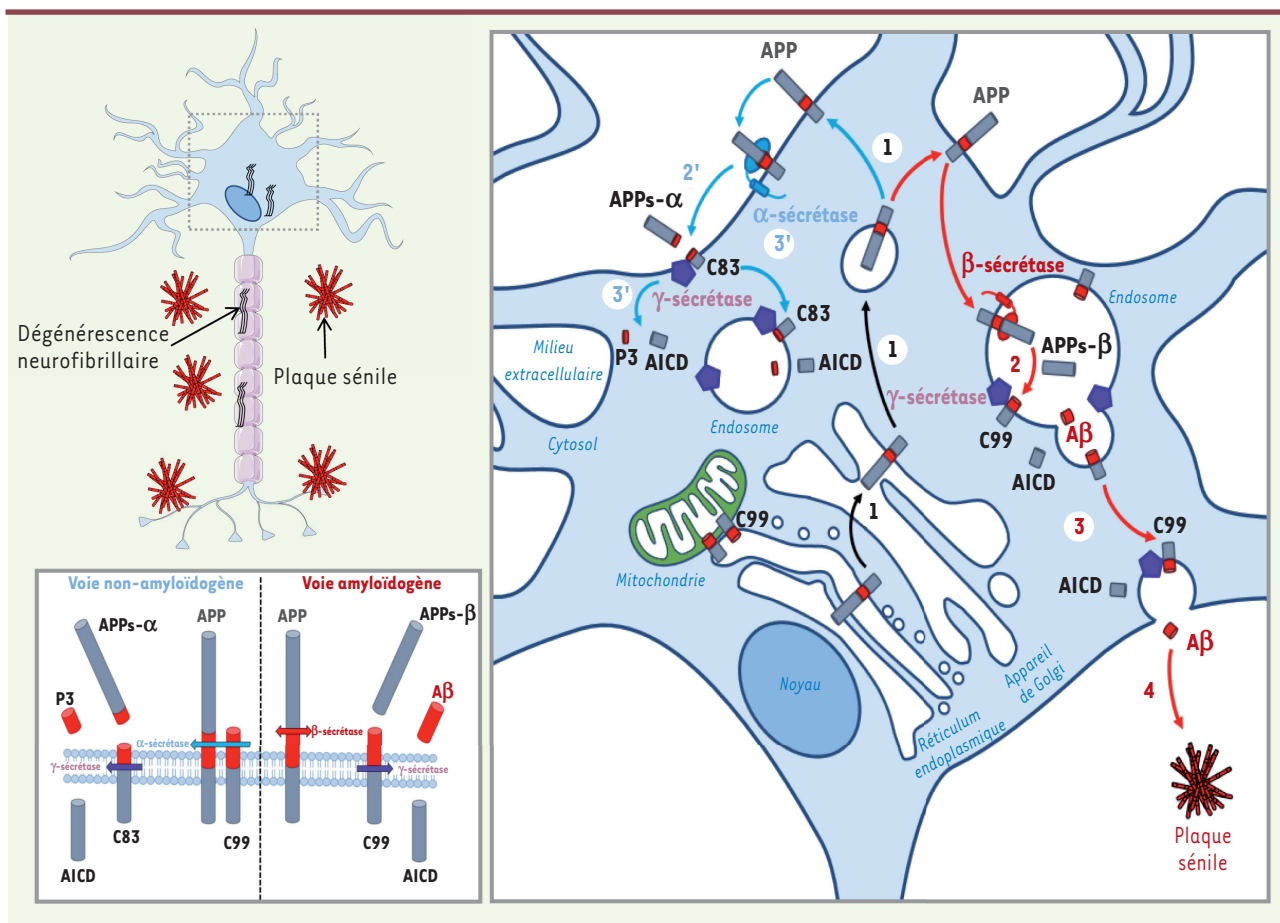


Figure 1. Représentation schématique de deux voies de protéolyse de l'APP : amyloïdogène (1 à 4) et non-amyloïdogène (1 à 3'). Dans les conditions physiologiques, l'APP mature est adressée à la membrane plasmique (1), produisant, après clivage par l' α -sécrétase (2'), le fragment soluble APPs- α et le fragment C83, qui reste ancré à la membrane. Ce dernier est ensuite clivé par le γ -sécrétase (3'), produisant les peptides p3 et AICD (APP intracellular domain). Par ailleurs, l'APP mature (1) est clivée par la β -sécrétase (2) après son internalisation dans la voie des endosomes/lysosomes, produisant le fragment soluble APPs- β , qui est libéré dans l'environnement extracellulaire, et le fragment C99 qui reste ancré dans la membrane et est ensuite clivé par le γ -sécrétase (3), produisant les peptides AICD et A β . La voie amyloïdogène est favorisée dans les formes familiales de la maladie d'Alzheimer. Dans les formes sporadiques, la baisse de la dégradation des peptides A β peut conduire à leur accumulation, à leur agrégation et à la formation des plaques séniles. Nous avons rapporté la présence et le clivage de l'APP dans les membranes associées aux mitochondries, et l'accumulation du fragment C99 dans la mitochondrie [7].

libération des neurotransmetteurs et à la plasticité synaptique. L'homéostasie des mitochondries nécessite leur dégradation par un processus autophagique spécifique, la mitophagie, qui se réalise en trois étapes [3] : 1) la modification (par phosphorylation ou ubiquitination) de certaines protéines mitochondriales pour signaler les mitochondries dysfonctionnelles ; 2) la séquestration de la mitochondrie dysfonctionnelle dans une vacuole autophagique (appelée mitophagosome) ; et 3) la fusion de cette vacuole avec les lysosomes contenant

des enzymes de dégradation afin de la détruire (Figure 2). Plusieurs études reposant sur des modèles *in vitro* et *in vivo* de la maladie d'Alzheimer [4], et l'analyse *post-mortem* de cerveaux d'individus atteints de cette maladie à des stades précoces [5], ont montré l'existence d'une altération de la structure du réseau et du métabolisme mitochondrial. Ces défauts ont généralement été associés à la présence du peptide A β [4]. L'existence d'un défaut de la mitophagie impliquant principalement

l'A β et la protéine Tau hyperphosphorylée a également été soulignée par certains auteurs [6]. Nous avons récemment démontré la présence et le clivage de l'APP dans les « membranes associées aux mitochondries » (*mitochondria-associated membranes*), des sites de contact entre mitochondries et réticulum endoplasmique, et rapporté la présence d'APP-CTF dans la mitochondrie (Figure 1) [7]. Cette observation nous a conduits à émettre l'hypothèse d'un rôle spécifique de ces APP-CTF dans le dysfonctionne-

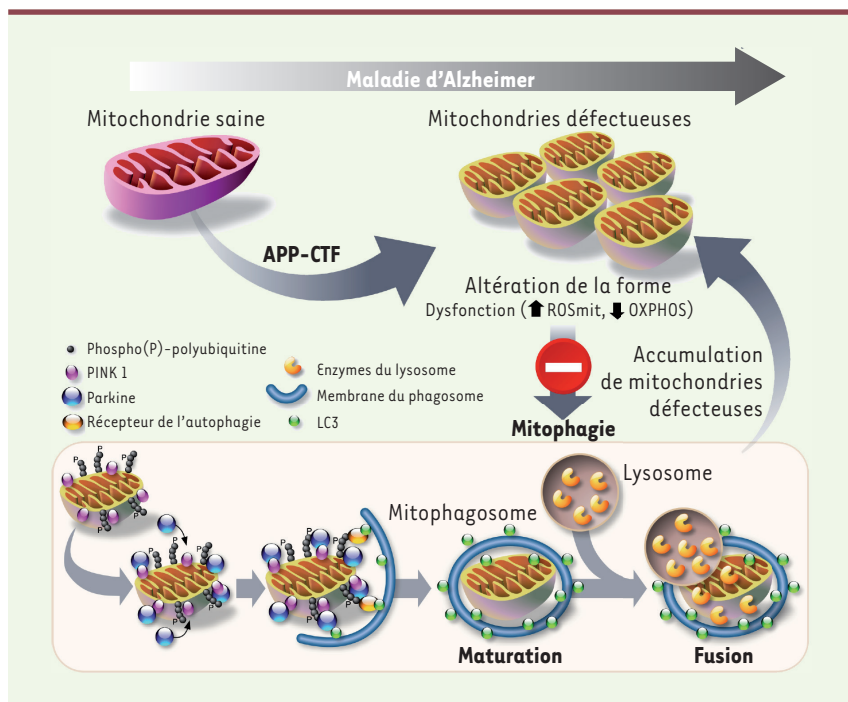


Figure 2. Impact de l'accumulation des fragments APP-CTF sur l'homéostasie mitochondriale dans des modèles d'étude de la maladie d'Alzheimer. L'accumulation des fragments APP-CTF dans la mitochondrie entraîne des altérations spécifiques de sa structure et de sa fonction. Cette accumulation entraîne également une défaillance de la mitophagie, un processus au cours duquel les mitochondries altérées sont habituellement dégradées. La mitophagie dépendante de l'interaction fonctionnelle entre PINK1 et la parkine débute par la stabilisation de la protéine PINK1 à la surface de la mitochondrie, consécutive à la dépoliarisation de la membrane mitochondriale, et son autophosphorylation, entraînant le recrutement de la parkine, une ubiquitine ligase, à la mitochondrie. Cette enzyme assure l'ubiquitination de plusieurs protéines mitochondriales, ce qui favorise le recrutement d'un autophagosome englobant la mitochondrie. Ce mitophagosome mature fusionne avec le

lysosome, dont le contenu riche en protéases actives à pH acide permet la dégradation de la mitochondrie et de ses composants. Dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation des fragments APP-CTF induit un blocage de la fusion du mitophagosome avec le lysosome, aboutissant à l'accumulation des mitochondries défectueuses. ROSmit : espèces réactives de l'oxygène dans la mitochondrie ; OXPPOS : phosphorylation oxydante.

ment mitochondrial dans la maladie d'Alzheimer [8].

L'accumulation des fragments APP-CTF induit des défauts de la structure et de la fonction des mitochondries

Nous avons utilisé une lignée cellulaire de neuroblastome humain (la lignée SH-SY5Y) dont les cellules surexpriment un APP portant une double mutation décrite dans une famille suédoise, Lys670Met et Asn671Leu (APP^{Lys670Met, Asn671Leu} également appelée APP^{sw}), qui favorise l'accumulation des APP-CTF et de l'A β [8]. Ces cellules contiennent des mitochondries de plus grande taille, avec une désorganisation de leurs crêtes et une perte de la densité de leur matrice. Afin d'établir la contribution respective de l'A β et des fragments APP-CTF dans l'altération de la structure de ces mitochondries, nous avons traité les cellules APP^{sw} avec un inhibiteur de la γ -sécrétase, bloquant ainsi la production d'A β au profit d'une accumulation d'APP-CTF (Figure 1). Par

des techniques de fractionnements sub-cellulaires et d'imagerie confocale, nous avons montré la présence et l'accumulation des APP-CTF dans les mitochondries, associées à une fragmentation du réseau mitochondrial et à une désorganisation et une localisation des crêtes à la périphérie de la matrice mitochondriale. Cette observation a été étayée par le blocage de la β -sécrétase (réduisant à la fois la production de l'A β et du fragment C99). Celui-ci prévient en effet la fragmentation des mitochondries, rétablit la densité de la matrice mitochondriale et normalise l'organisation des crêtes [8]. Parallèlement à l'altération de la structure des mitochondries, nous avons observé que les cellules de la lignée SH-SY5Y (APP^{sw}) présentent plusieurs signes d'un dysfonctionnement mitochondrial se manifestant par une diminution de la quantité de la sous-unité NDUFB8 (NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit B8) du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, associée à une baisse de son activité, une diminution du potentiel

de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi_m$), et une augmentation de la production des espèces réactives de l'oxygène dans la mitochondrie. L'utilisation d'inhibiteurs de la β -sécrétase et de la γ -sécrétase nous a permis de discriminer les effets dépendant du peptide A β (dépoliarisation de la membrane mitochondriale) de ceux dépendant à la fois de l'A β et des APP-CTF (déficit du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale). Par ailleurs, nous avons montré que l'accumulation des APP-CTF dans les mitochondries, indépendamment de l'A β , exacerbe la production des espèces réactives de l'oxygène. Enfin, grâce à l'analyse d'un modèle cellulaire exprimant le fragment C99 de l'APP de façon inductible (cellules SH-SY5Y C99), nous avons confirmé l'impact des APP-CTF sur les dysfonctions mitochondriales. Ce modèle montre en effet une accumulation des APP-CTF dans la mitochondrie, un défaut de l'expression et de l'activité du complexe I de la chaîne respiratoire, et une surproduction des espèces réactives de l'oxygène [8].

L'accumulation des fragments APP-CTF induit une défaillance de la mitophagie, indépendamment de l'Aβ

L'absence d'un phénotype apoptotique dans les cellules SH-SY5Y APP^{swe} et SH-SY5Y C99 traitées avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase nous a orientés vers l'étude de la mitophagie dans ces cellules. Par des approches biochimiques, associées à un fractionnement subcellulaire, nous avons quantifié différents marqueurs moléculaires de la mitophagie et avons analysé les différentes étapes du processus mitophagique par l'utilisation de différentes sondes fluorescentes et de l'imagerie. Dans les cellules SH-SY5Y APP^{swe}, nous avons observé les premières étapes du processus mitophagique, caractérisé par un enrichissement en protéine PINK1 (*PTEN-induced kinase 1*) dans la fraction mitochondriale, par le recrutement dans la mitochondrie de la parkine, une ubiquitine ligase, et par la conversion de la forme cytosolique LC3-I de la protéine MAP1LC3 (*microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3*) en LC3-II, la forme recrutée à la membrane des autophagosomes. Nos résultats indiquent cependant l'existence d'un blocage du processus mitophagique, révélé par l'absence de dégradation de la protéine SQSTM1/p62 (séquestosome 1 ou protéine de liaison à l'ubiquitine p62) et par l'accumulation de plusieurs protéines mitochondriales (TIMM23, TOMM20, HSP60 et HSP10). Cette défaillance de la mitophagie a été confirmée par la mise en évidence d'un défaut d'adressage et de fusion des mitochondries aux lysosomes. Nous avons ensuite montré que l'accumulation des APP-CTF, indépendamment de l'Aβ, exacerbe la défaillance de la mitophagie dans les cellules SH-SY5Y APP^{swe} et SH-SY5Y C99 [8].

L'accumulation des fragments APP-CTF entraîne une altération de la structure des mitochondries et une défaillance de la mitophagie dans des modèles murins de la maladie d'Alzheimer

Dans une étude précédente [9], nous avons rapporté une accumulation précoce des fragments APP-CTF (dès

l'âge de 3 mois) dans la structure hippocampique du cerveau de souris triple transgéniques (3xTgAD) portant la mutation familiale Met146Val dans le gène codant PS1 et surexprimant les protéines humaines APP^{swe} et Tau mutée (Tau^{Pro301Lys}) sous le contrôle du promoteur Thy1.2. Ces souris développent tardivement des plaques séniles (entre 6 et 12 mois) et des NFT (à l'âge de 15 mois). Nos travaux et ceux d'autres équipes ont montré par la suite l'implication des APP-CTF dans le défaut de l'autophagie et dans le déficit synaptique et cognitif [10, 11]. Nous avons montré l'existence d'une accumulation des APP-CTF dans la fraction mitochondriale chez des souris 3xTgAD jeunes (ne présentant pas encore de plaques séniles et n'ayant pas de peptide Aβ détectable), exacerbée par le traitement par l'inhibiteur de la γ -sécrétase. L'accumulation des APP-CTF induit une altération de la structure des mitochondries se manifestant par une matrice mitochondriale peu dense et par une désorganisation et une localisation des crêtes à la périphérie de la matrice mitochondriale. Ces défauts de la structure des mitochondries sont visibles dès trois mois chez des souris exprimant spécifiquement le fragment C99 par transduction virale (souris AAV-C99). Cette altération de la structure des mitochondries est accompagnée d'une mitophagie défaillante dans les deux modèles murins après le traitement avec l'inhibiteur de la γ -sécrétase, démontrant le lien entre l'accumulation des APP-CTF *in vivo* et une accumulation de mitochondries dysfonctionnelles [8]. Nous avons ensuite analysé la structure des mitochondries et la mitophagie dans le modèle 3xTgAD à un stade tardif. Une accumulation des APP-CTF, ainsi que les marqueurs histologiques caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (plaques séniles et NFT), ont été observés dans les cellules de ce modèle, comparativement aux cellules murines double transgéniques (2xTgAD)

qui accumulent les APP-CTF mais ne présentent pas les marqueurs histologiques liés à l'Aβ et pTau [9]. Nous avons montré l'existence, dans les deux modèles, d'une accumulation des APP-CTF dans la fraction mitochondriale, associée à une augmentation de la taille des mitochondries et à une organisation anormale de leurs crêtes. Ces résultats démontrent formellement que l'accumulation des APP-CTF est suffisante pour induire des altérations de la structure mitochondriale. Néanmoins, la comparaison de ces deux modèles murins a révélé la contribution tardive de l'Aβ dans l'activation du processus mitophagique chez les souris 3xTgAD âgées [8].

L'accumulation des APP-CTF est corrélée avec un défaut de la mitophagie dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer

L'analyse biochimique *post-mortem* des cerveaux de patients atteints de formes non familiales de la maladie d'Alzheimer à des stades avancés démontre une accumulation des APP-CTF (C99 et C83) et de l'Aβ dans la fraction mitochondriale, couplée à un défaut de la mitophagie caractérisé par une baisse des quantités de PINK1 et de parkine dans la mitochondrie, une augmentation du ratio LC3-II/LC3-I et de la protéine SQSTM1/p62. Nous avons rapporté une corrélation significative entre les niveaux du fragment C99 et les variations des marqueurs mitophagiques analysés, tandis que ces corrélations sont seulement partielles avec les taux d'Aβ et de pTau. Ce résultat a permis de valider, dans des échantillons humains, les résultats obtenus précédemment dans des modèles d'étude cellulaires et animaux mimant des formes génétiques de la maladie d'Alzheimer.

Perspectives

Les résultats de notre étude montrent qu'indépendamment de l'Aβ, l'accumulation des fragments APP-CTF

conduit à une détérioration de la structure et du fonctionnement des mitochondries, et à un blocage du processus de dégradation des mitochondries par mitophagie (Figure 2) [8]. L'accumulation de mitochondries défectueuses associée à la perturbation de la mitophagie est commune à différentes maladies neurodégénératives, telles que la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington, la sclérose latérale amyotrophique, et la maladie d'Alzheimer. Le rétablissement d'une fonction mitophagique normale pourrait donc être envisagé comme un nouvel objectif thérapeutique dans la maladie d'Alzheimer et dans d'autres maladies neurodégénératives. ♦

Mitochondrial dysfunction and mitophagy failure in Alzheimer's disease

LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

RÉFÉRENCES

1. De Strooper B, Karran E. The cellular phase of Alzheimer's disease. *Cell* 2016 ; 164 : 603-15.
2. Nhan HS, Chiang K, Koo EH. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol* 2015 ; 129 : 1-19.
3. Onishi M, Yamano K, Sato M, et al. Molecular mechanisms and physiological functions of mitophagy. *EMBO J* 2021 ; 40 : e104705.
4. Atamna H, Frey WH, 2nd. Mechanisms of mitochondrial dysfunction and energy deficiency in Alzheimer's disease. *Mitochondrion* 2007 ; 7 : 297-310.
5. Manczak M, Park BS, Jung Y, Reddy PH. Differential expression of oxidative phosphorylation genes in patients with Alzheimer's disease: implications for early mitochondrial dysfunction and oxidative damage. *Neuromolecular Med* 2004 ; 5 : 147-62.
6. Reddy PH, Oliver DM. Amyloid beta and phosphorylated Tau-induced defective autophagy and mitophagy in Alzheimer's disease. *Cells* 2019 ; 8 : 488.
7. Del Prete D, Suski JM, Oules B, et al. Localization and processing of the amyloid-beta protein precursor in mitochondria-associated membranes. *J Alzheimers Dis* 2017 ; 55 : 1549-70.
8. Vaillant-Beuchot L, Mary A, Pardossi-Piquard R, et al. Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains. *Acta Neuropathol* 2021 ; 141 : 39-65.
9. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, et al. The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not $A\beta$, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci* 2012 ; 32 : 16243-55a.
10. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, et al. Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces $A\beta$ -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol* 2016 ; 132 : 257-76.
11. Hung COY, Livesey FJ. Altered gamma-secretase processing of APP disrupts lysosome and autophagosome function in monogenic Alzheimer's disease. *Cell Rep* 2018 ; 25 : 3647-60 e2.



Annexe 2

Revue : « La mitophagie dans la maladie d'Alzheimer : défaillances moléculaires et approches thérapeutiques. »

Mitophagy in Alzheimer's disease: molecular defects and therapeutic approaches.

Arnaud Mary, Fanny Eysert, Frédéric Checler, Mounia Chami.

Travail en révision, Molecular Psychiatry.

- *Cette revue détaille les dysfonctions moléculaires de la mitophagie dans les modèles et chez les patients Alzheimer, et rapporte les résultats de différentes stratégies de modulation de la mitophagie dans le contexte de la maladie d'Alzheimer.*

Mitophagy in Alzheimer's disease: Molecular defects and therapeutic approaches

[Arnaud Mary](#)¹, [Fanny Eysert](#)¹, [Frédéric Checler](#)¹, and [Mounia Chami](#)^{#1}

¹ Institut of Molecular and Cellular Pharmacology, Laboratory of Excellence DistALZ, Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, Sophia-Antipolis, 06560, Valbonne, France.

Address correspondence to: mchami@ipmc.cnrs.fr.

Abstract

Mitochondrial dysfunctions are central players in Alzheimer's disease (AD). In addition, impairments in mitophagy, the process of selective mitochondrial degradation by autophagy leading to a gradual accumulation of defective mitochondria, have also been reported to occur in AD. We provide an updated overview of the recent discoveries and advancements on mitophagic molecular dysfunctions in AD-derived fluids and cells as well as in AD brains. We discuss studies using AD cellular and animal models that have unraveled the contribution of relevant AD-related proteins (Tau, A β , APP-derived fragments and APOE) in mitophagy failure. In accordance with the important role of impaired mitophagy in AD, we report on various therapeutic strategies aiming at stimulating mitophagy in AD and we summarize the benefits of these potential therapeutic strategies in human clinical trials.

Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a common and irreversible neurodegenerative disorder associated with age and characterized by two main histological hallmarks: the accumulation of amyloid beta (A β) aggregated in extracellular senile plaques, and the hyperphosphorylation of Tau protein (pTau) forming intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) (1). In sporadic AD (SAD), major clinical symptoms of the disease are a decline of cognition and memory capacities attributed to environmental and/or genetic susceptibility factors, the first discovered being the *Apolipoprotein (APOE)* gene (2). Familial AD (FAD) are linked to monogenic mutations in the *amyloid precursor protein (APP)* gene and in presenilin 1 (*PSEN1*) and presenilin 2 (*PSEN2*) genes encoding the catalytic cores of the γ -secretase complex (3). The discovery of AD-associated mutations led to the formulation of the amyloidogenic cascade hypothesis (Figure 1) defining enhanced A β production and decreased clearance as the major triggers of AD development (4).

Mitochondria are self-replicating cellular organelles present in all human cells, except in erythrocytes. Structurally, a mitochondrion is composed of two phospholipidic membranes. The outer mitochondrial membrane (OMM) ensures exchanges of calcium (Ca²⁺), metabolites, and lipids with the rest of the cytosol and with other organelles through transporters and channels. Structural and functional interplays link mitochondria with the endoplasmic reticulum (ER), through mitochondria-associated membranes (MAMs). The OMM is also the site of finely regulated events sensing mitochondrial-dependent cell death and their specific degradation, but also their dynamic fusion, fission and mobility. The inner mitochondrial membrane (IMM) is the site of mitochondrial oxidative phosphorylation (OXPHOS) process, involving five enzymatic complexes and two mobile electron carriers, that provide most of the cell energetic demands through the production of adenosine triphosphate (ATP). The mitochondria matrix encompasses the mitochondrial genome (mitDNA for mitochondrial DNA) and is the site of the tricarboxylic cycle, the function of which is tightly linked with OXPHOS reactions. This ensures the production of several important metabolites implicated in the biosynthesis of macromolecules such as nucleotides, lipids, and proteins. Beyond being the energy and metabolites providers, mitochondria generate reactive oxygen species (ROS_{mit}), that act as physiopathological sensors of a plethora of cell events including cell death, proliferation, differentiation and immunity. Dysfunctional mitochondria show altered membrane potential

($\Delta\Psi_{mit}$), generate less ATP and produce an abnormal amount of ROS_{mit}, inducing an oxidative stress ultimately leading to cell death. Physiological homeostasis of mitochondria is a balance between biogenesis and autophagic degradation that occurs via a selective process referred to as mitophagy. During this clearing pathway, unhealthy mitochondria are engulfed by a double-membrane (phagophore) forming the mitophagosome, which will then fuse with a lysosome to form a mitophagolysosome. In this structure, lysosomal hydrolases will digest mitochondria into small components that can then be recycled (Figure 2A). Studies have identified two major types of mitophagy activated by a plethora of stimuli and implicating specific receptors (Figure 2A).

As neurons are sites of high-demanding energetic processes, their homeostasis is highly dependent on mitochondria health and on the effectiveness of mitophagy. Neurons also harbor the specificity that distal damaged mitochondria are transported in a retrograde fashion back to the soma for their lysosomal degradation through a transport machinery including specific adaptors (i.e. Miro1) and scaffold proteins (TRAK proteins) anchored to microtubules through motor proteins (i.e. Dyneins).

This review discusses studies examining the status of mitophagy in AD patients, as well as in various *in vitro* and *in vivo* AD models. We provide insights into the specific impact of different actors implicated in AD etiology, including Tau, APOE4, presenelin1 (PS1), A β and APP-CTFs on mitophagy processes (Figure 2B). We also describe the different strategies (genetic, pharmacological and lifestyle) aimed at promoting the removal of excess dysfunctional mitochondria by mitophagy, and highlight their beneficial effects on various histological, biochemical, and behavioral phenotypes associated with AD.

EVIDENCE FOR IMPAIRED MITOPHAGY IN AD PATIENTS

AD brains

Impaired mitophagic degradation in AD has been suspected since the early 2000s. This was suggested by the accumulation of mitDNA and proteins in the cytoplasm as well as in autophagic vacuoles (AVs) in AD neurons featuring increased oxidative damages (5). AD brains analyses unraveled increased levels of mitochondrial proteins COX IV and TOMM20, and elevated ratio of mitDNA/nuclear DNA (6). Other results then supported reduced mitophagic degradation in patient brains with high levels of total and pTau protein, suggesting a participation of Tau protein in this phenotype. Mechanistically, an increase of PINK1 at early AD stages (Braak stage II-III) and of Parkin at a later stage (Braak stage VI), alongside with an increase of mitochondrial content markers at both early and late stages were reported in SAD hippocampi (7). This could suggest a reduced mitophagic flux linked to a defect in the initiation of the PINK1/Parkin cascade. This has been supported by another study reporting decreased mRNA and protein levels of PINK1 in hippocampi at late-stage AD (Braak stage V-VI) (8). In addition, Martín-Maestro *et al.* also reported a downregulation of various genes associated with autophagy and mitophagy, namely Optineurin (OPTN), ATG5, ATG12, Beclin-1 (Bcl-1), PI3K class III, ULK1, AMBRA1, BNIP3, BNIP3L, FUNDC1, VDAC1, and VCP/P97 in AD-affected brains (9). Accordingly, a downregulation of mitophagy actors (Bcl-1, ATG12, BNIP3, and PINK1) and an inhibition of mitophagy process (reduced p-S65-Ub and enhanced LC3-II and p62/SQSTM1 (referred hereafter as p62) levels) was also observed in the brains of APOE ϵ 4 heterozygote patients (10). This was thought to be likely associated with an elevation of the inactive and cytosolic-sequestered form of FOXO3a (Forkhead box O3a) transcription factor (10). In 2019, Fang *et al.* showed the accumulation of structurally and functionally damaged mitochondria (reduced size, disorganized cristae and less ATP production) in the hippocampus of AD patients (11). These alterations were associated with an impairment of the initiation steps of the mitophagy process (reduced activated LC3 recruitment to mitochondria) occurring downstream of a dysfunctional AMP-activated protein kinase (AMPK) cascade characterized by the phosphorylation of AMPK and the inhibition of its targets ULK1 and TBK1

(11). Accordingly, these observations were consolidated by the report of a defective fusion of mitophagosomes with lysosomes (11) and an accumulation of damaged mitochondria in AVs (12) in AD brains. Interestingly, our laboratory also reported defective mitophagy in a cohort of human SAD brains (Braak stage IV-VI) supported by an increase of LC3-II/I ratio and of p62 and a reduction of PINK1 and of Parkin levels in mitochondria-enriched fraction (13). It is worth noting that while all mitophagic markers variations correlated with APP-CTFs accumulation, A β and pTau levels only correlated with reduced Parkin and increased LC3-II/I ratio, suggesting a stronger correlation of mitophagy failure with APP-CTFs accumulation in human AD brains (13).

The retrograde transport of distal damaged mitochondria towards the neuron soma where they should be degraded in mitolysosomes is also impaired in AD patients. Indeed, Wang *et al.* reported that DISC1, a protein regulating axonal mitochondria trafficking, is less abundant in AD prefrontal cortices (14). Strikingly, they also demonstrated a novel role for DISC1 as a mitophagy receptor present in both OMM and IMM, that recruits phagophores to damaged mitochondria by binding to LC3-II through its LIR (LC3-interacting region) motif (14).

AD patient-derived cells and fluids

Skin fibroblasts from SAD patients also display dysfunctional autophagy and mitophagy illustrated by reduced formation of AVs, lower number of lysosomes and accumulation of TOMM20 mitochondrial marker (7). Parkin levels are also reduced in mitochondria-enriched fraction, even upon mitophagy stimulation with the mitochondrial membrane uncoupler (CCCP treatment), known to trigger PINK1 stabilization to the mitochondria and, thereby, enhancing Parkin recruitment and phosphorylation (7). Other studies demonstrated that SAD fibroblasts feature “aged mitochondria” and harbor an impaired capacity of degrading them (9, 15). This phenotype has been further supported by using MitoTimer probe that allows to follow the maturation of mitochondria by recording a shift of the emission wavelength. This demonstrated that fibroblasts from healthy individuals display a spatial maturation gradient, with a localization of young mitochondria at the periphery and old mitochondria surrounding the nucleus. Strikingly, they reported that SAD fibroblasts do not display such distribution, but rather showed altered mitochondria transport to the degradation site and an accumulation of dysfunctional mitochondria (15). Martín-Maestro *et al.* additionally demonstrated impaired autophagy and mitophagy in fibroblasts of a FAD patient harboring a PS1(A246E) mutation and in induced pluripotent stem cells (iPSC)-derived neurons (16). Both models showed enhanced LC3-II levels and impaired lysosomal degradation capacities reflected by accumulations of p62 and TOMM20. However, unlike SAD fibroblasts, Parkin levels were increased in FAD PS1(A246E) fibroblasts (16). Other studies also report lysosomal defects in human FAD fibroblasts with other *PS1* mutations linked to lysosomal alkalization, reduced cathepsin D activity and overall lowered macroautophagic degradation (17, 18). Martín-Maestro *et al.* also evidenced a downregulation of autophagy in iPSC-derived neural stem cells (NSC) Knocked-in (KI) for PS1(M146L) characterized by decreased LC3 level and ULK1 activation, accumulation of p62 and reduced TFEB expression and LAMP1 levels reflecting decreased lysosomal activity (19). These observations were also accompanied by a blockade of the mitophagy process illustrated by an enhancement of PINK1 and Parkin levels and by the recruitment of Parkin to the mitochondria. This led to an impairment of the recruitment of the phagophore, resulting in the accumulation of mitochondria revealed by an elevated number of mitDNA copies and enhanced TOMM20 level (19). Interestingly, Fang and colleagues also described an autophagy failure in iPSC-derived cortical neurons obtained from APP(V717L) and APOE ϵ 4 patients characterized by reduced levels of Bcl-1 and LC3-II and of the number of autophagosomes and autolysosomes (11). These cells also showed impaired mitophagy, since phosphorylations of TBK1 and ULK1 were reduced as well as the levels of several mitophagic proteins (11) (Table 1). Neuroblastoma SH-SY5Y cybrid cells depleted from their mitochondrial content and complemented by mitochondria from AD patient platelets show altered mitochondrial structure and activity (reduced ATP and enhanced ROSmit productions) associated with impaired mitophagy likely linked to PINK1 downregulation (20).

Interestingly, impairments of mitophagy were also reported in the peripheral fluids of AD patients as evidenced by a reduction of the autophagic ATG5 factor and of Parkin levels in the serum (21), and a decrease of Parkin alongside with an increase of PINK1 and LC3 mRNA levels in peripheral blood (22). From these studies have emerged the idea to use mitophagy molecular actors as peripheral biomarkers of AD. Conveniently, Watzlawik *et al.* have recently developed a sensitive sandwich ELISA allowing the detection of p-S65-Ub levels in different tissues (23) and reported elevated p-S65-Ub levels in the frontal cortex of AD patients (late Braak stage V-VI) compared to control individuals (23).

Studies in post-mortem human brains evidenced defective mitophagy at both early and late AD stages due to alterations of several key steps of the process (Table 1). The use of human derived cells with FAD mutations has unraveled the potential implication of AD molecular actors (i.e. APP, PS1, APOE4) (Table 1). Nonetheless, even if these studies pointed out mitophagy impairments as key mechanisms in AD pathogenesis, the specific implication of AD-related proteins, namely pTau, truncated forms, A β peptides and other APP-derived fragments and APOE genotype in these alterations was formally demonstrated in AD cellular and animal models.

EVIDENCE FOR IMPAIRED MITOPHAGY IN AD MODELS

Tau protein

Studies of the impact of Tau protein on mitophagy has produced some results that could appear paradoxical. It was reported that the neurotoxic 20-22kDa NH₂-Tau fragment (NH₂hTau), corresponding to the 26 and 230 amino acids of the longest human tau isoform, harmfully stimulates mitochondrial degradation by mitophagy (24). The expression of NH₂hTau in mature hippocampal primary neurons triggers synaptic alterations, alters mitochondria structure and accelerates mitophagic flux, thereby decreasing mitochondria biomass (24). Further, pharmacological or genetic inhibition of mitophagy prevented NH₂hTau-mediated injuries (25). Authors postulated that the accumulation of NH₂hTau fragment may contribute to synaptic injuries in AD by exacerbating mitophagy activity. However, other studies rather reported an inhibitory effect on mitophagy triggered by full-length human wild-type Tau accumulation (6, 26). Hu *et al.* showed that hTau overexpression leads to an accumulation of total and pTau in the OMM fraction, and to an increased $\Delta\Psi_{mit}$. This resulted from preventing the recruitment of PINK1 and Parkin to the mitochondria, thereby causing the accumulation of dysfunctional mitochondrial (6). In addition, Cummings *et al.* found that the overexpression of both hTau and hTau(P301L) (a frontotemporal dementia-associated mutation) inhibited mitophagy in neuroblastoma cells and in *C. elegans* model (26). Authors noticed that mitophagy blockade was not due to a change in the $\Delta\Psi_{mit}$ but to an aberrant interaction between the projection domain of Tau protein and Parkin, impairing its translocation to damaged mitochondria (26). The *C. elegans* BR5270 strain expressing the pro-aggregant F3 Δ K280 hTau fragment in neurons, shows dysfunctional mitochondria and a reduced number of mitophagy events (11). Interestingly, to avoid any inaccurate conclusion linked to overexpression strategies, the group of Nehrke, K. studied a transgenic *C. elegans* model in which a single-copy of hTau was expressed (27). While single-copy expression of hTau did not elicit overt pathological phenotypes, AD-related post-translational (PTM) Tau mimetics (T231E and K274/281Q) exhibited age-dependent behavioral and neuronal morphological abnormalities. They also reported that PTM mutants lacked the ability to engage in neuronal mitophagy in response to mitochondrial stress induced by paraquat (27).

Together, these results demonstrated that mitophagy impairment may be linked to Tau pathogenesis and stressed that distinct conclusions could be drawn according to the model used and/or the nature of the Tau protein analyzed (Figure 2B and Table 2).

A β peptides

Again, studies on the influence of A β peptides on mitophagy raised divergent conclusions. A first study reported that a 12h exogenous application of A β_{1-42} peptide at 7 μ M on rat

pheochromocytoma cells (PC12) triggered an impaired mitophagy characterized by reduced levels of mitophagy initiators (PINK1, Parkin, Bcl-1 and LC3-II/I ratio), as well as an accumulation of the mitophagic receptor p62 (28). Conversely, another study reported that a longer (24h) exogenous application of A β ₁₋₄₂ peptide at an almost similar concentration (5 μ M) rather induced an increase of Parkin, Bcl-1, and LC3-II/I in PC12 cells (29). Corroborating the latter study, an increase in PINK1, Parkin, LC3-II, and Bcl-1 expressions associated with mitochondrial dysfunction, reflected by reduced $\Delta\Psi$ _{mit} and of ATP level and enhanced ROS_{mit} production, was observed in murine embryonic hippocampal neurons after 72h of treatment (30). Authors also demonstrated impaired downstream mitophagy events including a blockade of the fusion of phagophores with lysosomes (30). These results point toward either a defective elimination of dysfunctional mitochondria by mitophagy linked to A β ₁₋₄₂, characterized by a defective initiation of mitophagy or alternatively, toward a normal mitophagy initiation followed by a blockade at later steps of the process. Oligomeric A β ₁₋₄₂ (oA β ₁₋₄₂) treatment of human non-neuronal cells (HEK293T) also caused an induction followed by a blockade of mitophagy process, as demonstrated by an increase of Parkin levels as well as of the LC3-II/I ratio and an accumulation of p62 in the mitochondrial fraction (31). The conclusion of a defective mitophagy linked to oA β ₁₋₄₂ application was strengthened by the observation of an accumulation of both autophagosomes and mitochondria (31). These data were validated *in vivo*. Indeed, intracerebroventricular injection of A β ₁₋₄₂ in rats triggers reduced levels of PINK1, Parkin, and Bcl-1 and an accumulation of p62 (32). Similarly, reduced mitophagy activity was also reported in A β ₁₋₄₂-expressing *C. elegans* (11). Interestingly, PINK1 overexpression reduces APP and A β ₁₋₄₂ levels *in vivo*, thereby demonstrating the ability of PINK1 to rescue A β ₁₋₄₂-associated defects (8). In mice expressing hAPP^{swe/Ind}, Tammineni *et al.* found that A β peptide and soluble oA β interact with AVs, causing their impaired axonal retrograde transport and their accumulation in neuron terminals (33). Guglielmo and collaborators reported that the monomeric A β ₁₋₄₂ (moA β) also triggers a blockade of the autophagy flux in differentiated human neuroblastoma cells (SK-N-BE). This was evidenced by the accumulation of p62 and of autophagosomes and by reduced lysosomal activity (34) (Figure 2C and Table 2).

APP-CTFs

The APP Intracellular Domain (AICD) generated by the cleavage of C83 or C99 fragments by γ -secretase (Figure 1) transcriptionally controls the expression of key genes implicated in AD (35). Our team recently reported that AICD controls mitophagy through the transcriptional activation of *PINK1* (36). The study depicted the molecular cascade linking PINK1 to mitophagy process by demonstrating that PS1, but not PS2, triggers the transactivation of *PINK1* promoter in a FOXO3a-dependent manner and that enhanced mRNA and protein level of PINK1 is linked to γ -secretase activity and to APP but is independent of the phosphatase and tensin homolog PTEN (a regulator of PINK1 kinase activity). The study also unraveled that the modulation of the γ -secretase activity or AICD expression affects the control of mitophagy markers in a PINK1-dependent manner (36). Interestingly, we revealed a regulatory loop in which Parkin, that transcriptionally controls PS1 and PS2 (37), acts upstream of *PINK1* to promote AICD-mediated regulation of PINK1 expression. Emerging data suggest that the early accumulation of C99, rather than that of A β , correlates with autophagy and mitophagy defects in AD. Accordingly, C99 accumulation was found to occur in several AD transgenic mice models and in APP KI mice harboring single or several APP FAD mutations (38). Importantly, a recent study reported that C99 accumulation correlates with neuronal vulnerability in human AD-affected brains (39). Studies by our group and others demonstrated that C99 accumulation induces impaired lysosomal-autophagic functions, independently of A β (40). This adverse effect appears to be due to the aggregation of C99 within the endosomal-autophagic-lysosomal-vesicle membranes likely contributing to synaptic dysfunction and behavioral deficits (40-42). C99-mediated endolysosomal dysfunctions have also been reported in human iPSC harboring AD-related *APP* or *PS1* mutations displaying endogenous APP level expression (43, 44), thus indicating that impaired lysosomal-autophagic functions is not an artifact due to an overload of mutated APP or C99 fragment in overexpressing models. In

addition, our laboratory and others delineated the processing of APP in MAMs and the accumulation of APP-derived fragments in this microdomain impacting MAMs function (45-47). Of most interest, MAMs have been described as an important hotspot for mitophagy (48). Upon mitophagy induction, PINK1 and Bcl-1 re-localize in MAMs to promote phagosome formation (49). Next, Parkin-dependent and PINK1 phospho-ubiquitination of the ER-mitochondria tether MFN2 uncouples mitochondria and permits its engulfment and mitophagic degradation (50). It is noteworthy that an increase number of ER and mitochondria contact sites was reported in AD study models and human brains (45, 51). In a recent study, we reported that APP-CTFs accumulate in the mitochondria-enriched fraction of human neuroblastoma cells expressing human APP harboring the Swedish familial mutation (SH-SY5Y-APP^{swe}) that promotes A β and APP-CTFs production (13). We first unraveled mitochondrial structure (i.e. cristae disorganization) and function alterations in these cells and reported an activation of the first steps of mitophagy characterized by increased levels of PINK1, Parkin, and LC3-II/I ratio. However, we observed that the overall mitophagy process was blocked as revealed by the lack of p62 degradation, the accumulation of several mitochondrial proteins (TIMM23, TOMM20, HSP60, and HSP10) and by impaired mitophagosome-lysosome fusion. Importantly, mitochondria structure alteration, ROSmit production and mitophagy failure phenotypes were exacerbated by the γ -secretase inhibition (that blocks A β production and potentiates APP-CTFs (C99 and C83) accumulation). On the contrary, β -secretase inhibition (that prevents both A β and C99 production) tends to ameliorate mitochondria structure and to rescue complex I activity defect and $\Delta\Psi_{mit}$ depolarization. We further confirmed the role of APP-CTFs on ROSmit overproduction and mitophagy failure in SH-SY5Y cells expressing C99 fragment only. APP-CTFs accumulate in neuronal mitochondria of the 3xTgAD mice, before any detection of amyloid plaques, as well as in adeno-associated virus C99 (AAV-C99) injected mice. Of most interest, the inhibition of the γ -secretase in 3xTgAD mice exacerbated mitochondrial structure alterations and hampered mitophagy process. Altogether, our results firmly demonstrated the contribution of APP-CTFs, independently of A β , to mitophagy defects in AD (13) (Figure 2D and Table 2).

APOE4

APOE is a glycoprotein mainly expressed in astrocytes, microglia, neurons and in the choroid plexus. APOE acts as a lipid transporter, notably for cholesterol and cholesterol esters. APOE is a polymorphic gene encoding for three major APOE epsilon (ϵ) isoforms with differential binding with lipids. It is now established that APOE ϵ 2 confers a decreased risk of AD in comparison with the APOE ϵ 3 allele. Conversely, a single APOE ϵ 4 allele increases the risk of AD four-fold compared to the common APOE ϵ 3/ ϵ 3 genotype while the presence of two APOE ϵ 4/ ϵ 4 alleles augments the risk of AD by approximately twelve-folds. The impact of APOE4 on mitophagy was thoroughly scrutinized in recent years. Comparison of APOE genotypes indicated a larger accumulation of mitochondrial and aggregated proteins in glioblastoma T98G cells expressing APOE4 vs APOE3 (52). This has been linked to a blockade of autophagy and mitophagy processes likely due to the binding of APOE4 to CLEAR (coordinated lysosomal expression and regulation) DNA motifs, thus competing with TFEB and compromising TFEB-mediated transcriptional up-regulation of *p62/SQSTM1*, *MAP1LC3B*, and *LAMP2* genes (52). Comparative transcriptomic analyses of human post-mortem brains indeed revealed that APOE ϵ 2/ ϵ 3 carriers, compared to APOE ϵ 3/ ϵ 4 and APOE ϵ 4/ ϵ 4 carriers, displayed upregulated *MAP1LC3B*, *p62/SQSTM1*, *NBR1*, *OPTN*, and *BNIP3* transcription (53). APOE4 mice display higher mitochondria markers levels (TOMM40 and COX1) and reduce cristae density in hippocampal neurons as compared to APOE3 mice (54). These observations suggest a diminished mitophagic capacity and an accumulation of damaged mitochondria linked to APOE4 expression. The investigation of the underlying molecular mechanisms further indicated an initiation of mitophagy reflected by a reduction of cleaved PINK1, a sign of reduced $\Delta\Psi_{mit}$, and by elevated Parkin levels in APOE4 mice (54). However, as reported in other APOE study models, the mitophagy appears to be blocked in later steps, as evidenced by increased p62 and mitochondria markers (54). A recent study reported that APOE4 expressing astrocytes

showed impaired mitochondrial function and exhibited reduced fission and mitophagy characterized by reduced active Parkin and LC3-II proteins, accumulated p62 and by defective ubiquitination and proteasomal/lysosomal degradation of mitochondrial dynamic proteins (55). Finally, mitophagy is also impaired in iPSC-derived cortical neurons derived from APOE ϵ 4/ ϵ 4 SAD patients, since the phosphorylation levels of mitophagy initiators TBK1 and ULK1 as well as PINK1, LC3-II and Bcl-1 were reduced compared to control neurons (11). In addition, it should be noted that the APOE ϵ 4 SAD risk factor is also associated with increased cholesterol plasma levels, atherosclerosis, and oversupply of cholesterol to neurons (56). Strikingly, it was recently described that increased intracellular cholesterol content could, by itself, impact mitophagy (57). Indeed, acute enrichment of cholesterol in neuroblastoma SH-SY5Y cells impairs the mitophagy flux by hampering mitochondria delivery to lysosomes, even in the presence of oA β ₁₋₄₂ or of the mitochondrial uncoupler CCCP (57). Accordingly, chronic cholesterol accumulation in aged mice also impairs mitophagosome formation by reducing OPTN mitochondrial translocation (57) (Figure 2E and Table 2).

MITOPHAGY STIMULATION IN AD STUDY MODELS AND POTENTIAL CLINICAL APPLICATIONS

Genetic strategies

Several genetic approaches targeting components of the mitophagy machinery have been used to alleviate toxic insults linked to the accumulation of disease-associated dysfunctional mitochondria. The overexpression of Parkin through the use of lentivectors in SAD fibroblasts improves autophagy flux and greatly favors the degradation of accumulating mitochondria (7). Parkin overexpression also ameliorates mitochondrial functions through a recovery of $\Delta\Psi_m$ (7). In another report, Parkin overexpression in A β -treated HEK293T cells, was able to increase cytosolic and translocated Parkin levels, mitochondrial LC3-II level, and to reduce mitochondrial p62 levels, globally indicating a rescue of mitophagy in these cells. Parkin overexpression also attenuated A β -induced mitochondrial fragmentation and dysfunctions as evidenced by elevation of $\Delta\Psi_{mit}$, complex I, II and IV activities, ATP production and by lowering ROS_{mit} production (31). Other studies investigated the impact of PINK1 in a preclinical AD model showing that intra-hippocampal stereotaxic injections of AAV2-hPINK1 in 6-month-old transgenic mice overexpressing hAPP bearing the Swedish and the Indiana (V717F) mutations triggered an induction of mitophagy via an upregulation of OPTN and NDP52 mitophagic receptors (8). Importantly, PINK1-injected mice harbored reduced A β pathology (number of plaques and mitochondrial A β accumulation) in the hippocampi and show normal mitochondrial function, reduced synaptic loss as well as improved synaptic function and learning memory (8). DISC1 protein is known to regulate anterograde and retrograde axonal mitochondria transports. But its newly discovered function as a mitophagy receptor via a LIR-motif-dependent binding of LC3 further support the importance of DISC1 in mitophagy (14). *In vitro*, DISC1 siRNA inhibited oA β ₁₋₄₂- or CCCP-induced mitophagy, while DISC1 overexpression triggered an LC3-dependent mitophagy and rescued oA β ₁₋₄₂-induced mitochondrial and synaptic defects (14). Supporting these *in vitro* findings, DISC1 overexpression in APP^{swe}/PS1 Δ E9 (APP/PS1) mice reduced amyloid plaque density, synaptic loss and cognitive defects, through the promotion of mitophagy (14). In neurons, the adaptor protein Snapin participates, with the motor protein Dynein, in the retrograde transport of distant mitophagosome to the soma, to complete mitophagic degradation (33). Deficiency of Snapin in wild type murine brains recapitulates AD synaptic defects by inhibiting Snapin-mediated retrograde transport and causing presynaptic mitophagic stress (33, 58). As mitophagosomes can no longer be transported back to the soma, they accumulate at presynaptic sites, causing a reduction of synaptophysin in presynaptic terminals. On the contrary, Snapin overexpression diminished the presynaptic mitochondria stress and synapses loss in hAPP^{swe}/ind AD mice, by facilitating the retrograde transport of axonal mitophagosomes (33, 58). Finally, Miro1 (a mitochondrial Rho GTPase implicated in mitochondrial anterograde and retrograde transport) (59) has also recently been suggested to

be involved in the mitophagy process (60). In fact, Miro1 interacts with Parkin and triggers its activation and recruitment to damaged mitochondria to initiate mitophagy. Also, Miro1 overexpression rescued damaged mitochondrial morphology and motility and mitigates $\alpha\beta$ -mediated mitophagy (61).

Pharmacological strategies

Urolithin A (UA), derived from ellagitannins polyphenols, is known to induce beneficial effects on mitochondrial homeostasis and functions through the stimulation of mitophagy in nematodes and mammals (62). Recently, Fang *et al.* studied the impact of UA in various *in vivo* AD models and described significant improvements of pathological parameters via an induction of mitophagy (11). Hence, the treatment of *C. elegans* expressing $A\beta{1-42}$ and of APP/PS1 mice with UA reduced $A\beta$ pathology and cognitive decline, via the activation of PINK1/Parkin-dependent mitophagy. UA was also shown to rescue mitochondria structural and functional defects and to increase synapse number. Further, UA decreased mitochondrial damage in microglia, stimulated the phagocytic clearance of $A\beta$ plaques and reversed inflammatory responses. UA treatment also enhanced memory and reduced Tau hyperphosphorylation in the 3xTgAD mice (11). The first human clinical trial of UA (500mg and 1,000mg for 4 weeks) in healthy sedentary elderly individuals demonstrated its safety and its benefit by modulating mitochondrial gene expression (NCT02655393) (63).

_Actinonin (AC) is a natural antibacterial compound showing similar effects than UA (11). AC treatment was able to avert memory defects and to reduce APP-CTFs load and $A\beta$ burden in an AD nematode model. In APP/PS1 mice, AC also restored mitochondria morphology and functions and enhanced synapse number by stimulating mitophagy. Interestingly, AC promoted mitophagy in microglia by stimulating $A\beta$ plaque clearance and reducing neuro-inflammation.

NAD⁺ boosters (nicotinamide riboside (NR), nicotinamide mononucleotide (NMN)) are robust inducers of mitophagy (64). In *C. elegans* expressing $A\beta{1-42}$, NR induced mitophagy, reduced $A\beta$ burden and proteotoxic stress, and boosted health and lifespan (65) while NMN enhanced PINK1/Parkin mitophagy and reverses memory defects in this model (11). NR also reduced cortical $A\beta$ deposits, enhanced PINK1, LC3, and OXPHOS protein mRNA levels, and improved cognitive functions in APP/PS1 mice (65). Several clinical trials are ongoing to assess the effect of NR on brain function, cognition, oxidative stress, or CSF pTau levels in MCI (mild cognitive impairment) and AD patients (NCT02942888, NCT04078178, NCT04430517, NCT03482167 and NCT03061474). However, Nicotinamide failed to improve cognitive functions in a small clinical trial of patients with mild to moderate AD (66).

_Trehalose is a natural disaccharide acting as an mTOR-independent autophagy inducer, and a TFEB and lysosomal activator. It protects mitochondria from oxidative stress via a BNIP3-induced mitophagy (67, 68). Trehalose administration *in vivo* showed neuroprotective benefits in different AD mouse models (69).

Resveratrol (3,5,4'-trihydroxy-*trans*-stilbene), a natural polyphenolic molecule acting as a ROS scavenger, an iron chelator and an autophagy and mitophagy inducer (70). It displays several beneficial effects in the context of AD (70). Resveratrol protects PC12 cells from death, oxidative stress and mitochondrial damage induced by $A\beta{1-42}$ by promoting mitophagy (29). Long-term oral administration of resveratrol in APP/PS1 mice improved memory as well as mitochondrial functions, activated SIRT1 and AMPK pathways and reduced $A\beta$ load (71). Nevertheless, this molecule has a major clinical drawback, since it is metabolically unstable and thus offers a poor bioavailability (72).

_Bexarotene is a synthetic molecule used as a retinoic X receptor agonist. Bexarotene enhanced $A\beta$ clearance, improved cognitive deficits in APP/PS1 mice (73), and reduced Tau levels in the CSF and the memory deficit in a patient with mild AD (74). Recently, Martín-Maestro *et al.* demonstrated that Bexarotene stimulated autophagy and PINK1/Parkin-dependent mitophagy in FAD PS1 (M146L) NSC, thus allowing the elimination of dysfunctional mitochondria and restoring the mitochondrial network morphology (19).

_Tetrahydroxy stilbene glycoside is extracted from the traditional Chinese medicinal herb *Polygonum multiflorum* and was described to harbor neuroprotective effects in AD (75). This

beneficial effect seems to occur by targeting autophagy and mitophagy through the AMPK/PINK1/Parkin cascade (76).

_β-Asarone, the main effector of *Acorus tatarinowii* Schott herbal medicine activated autophagy and mitophagy and alleviated Aβ₁₋₄₂ cytotoxicity *in vitro* (28). Studies *in vivo* reported that β-Asarone had beneficial effects against Aβ-related pathology through the inhibition of autophagy in APP/PS1 mice (77) and decreased Aβ₁₋₄₂ brain levels. Another study rather described that β-Asarone improved learning and memory in rats injected with Aβ₁₋₄₂ by promoting mitophagy (32).

_The circadian hormone melatonin, mostly holds several physiological roles among which neuroprotection. Sun *et al.* recently reported that long-term oral administration of melatonin in PS1 mice had a neuroprotective action by improving mitochondrial structure and mitigating the excessive mitophagy through a reduction of the expression of mitophagy proteins (PINK1, Parkin, LC3-II/LC3-I) and of the number of mitophagic vesicles (78). Melatonin treatment also down-regulated APP processing and improved spatial learning and memory defects (78).

_Spermidine is a small and natural organic molecule known to prolong lifespan of yeast, flies, nematodes and mice by upregulating autophagy (79, 80). It also stimulates the PINK1/Parkin mitophagy pathway in human fibroblasts (81). Interestingly, it has recently been documented that spermidine extended the lifespan and prevented memory loss in a PINK1/Parkin-pathway-dependent fashion in *C. elegans* expressing human Aβ and Tau (82). In humans, a clinical trial in elderly subjects with MCI, concluded that spermidine may improve hippocampal-dependent memory (NCT02755246) (83).

_UMI-77 is a small BH3-mimetic recently identified in a large screen as mitophagy inducer targeting the mitophagy receptor MCL-1 (84). UMI-77 normalized mitochondrial morphology and induced mitophagy in APP/PS1 mice (84) triggering a rescue of learning and memory capacities, a reduction of the amyloid pathology and of neuroinflammation (84).

_Metformin (MET), derived from the gelegine of the medicinal plant *Galega officinalis*, is a proven anti-hyperglycemic drug used in the context of Type 2 diabetes mellitus (T2DM). MET promotes mitophagy via the activation of AMPK *in vivo* and in humans (85-87). It was demonstrated that MET stimulated the autophagic clearance of pTau *in vitro* in HT22 cells incubated with high glucose and *in vivo* in the hippocampus of diabetic mice, thereby rescuing their cognitive impairments (88). In AD preclinical studies, MET reduced Tau phosphorylation in murine primary neurons expressing hTau via the activation of the PP2A phosphatase (89), and prevented amyloid plaques formation, cognitive impairment and chronic neuroinflammation in APP/PS1 mice (90). A short clinical trial (8 weeks) in AD patients with a high-dose oral administration of MET demonstrated both the presence of MET in the CSF, and the improvement of executive functions, learning, memory and attention (NCT01965756) (91). A Phase II/III prevention trial, called Metformin in Alzheimer's Dementia Prevention, is ongoing and includes 370 AD patients treated with 2,000mg of MET per day or with a placebo for 2 years (NCT04098666). T2DM is considered a risk factor of developing SAD (92). Of most interest, T2DM patients treated with MET show a lower risk of dementia compared to untreated T2DM patients (93). Accordingly, a meta-analysis also concluded that the incidence of both dementia and cognitive impairments were significantly lower in MET-treated diabetics (94).

Lifestyle strategies

Physical exercise (PE) is already used in the context of several metabolic or mental disorders and has been reported to be beneficial in the context of AD (95), even though the precise mechanism remained unknown. In AD mouse models, PE provided beneficial effects on synaptic plasticity alterations, restored neuroprotective factor levels, improved cognitive deficits and reduced Aβ production. Several studies converged to propose that PE acted through the SIRT1/PINK1/Parkin signaling pathway (96-98). Moreover, in APP/PS1 mice, PE increased mitophagy and ameliorated learning and memory capacities, Aβ burden, synaptic activity, and mitochondrial structural and functional alterations (99). Caloric restriction (CR) is a strong activator of mitophagy (100). In AD mice models, CR up-regulated SIRT1 and NAD⁺ levels (101), reduced hippocampal Aβ and Tau load (102, 103) and ameliorated behavioral deficits (103).

CONCLUSION

This review summarized up-to-date studies linking mitophagy failure to AD pathogenesis. Data in human post-mortem brains and derived cells highlighted that mitophagy failure is common to both SAD and FAD cases. Studies in preclinical AD models, convincingly demonstrated that several AD actors (Tau, A β , APP-CTFs, APOE4, PS1 mutants) impair the degradation of dysfunctional mitochondria. Genetic targeting of deficient mitochondrial mitophagic degradation by overexpressing proteins implicated at different steps of this process resulted in a significant rescue of several AD stigmata. These consensual results supported the idea that rescuing mitophagy in AD could be an effective therapeutic strategy. In fact, several molecules able to stimulate mitophagy have shown positive effects in preclinical AD models. Some of these drugs have also been administered to healthy or AD patients at various stages in clinical trials (UA, Nicotinamide, spermidine, and MET). However, there is still a need to optimize these drug candidates and particularly their bioavailability (i.e. biodegradation, crossing of the blood brain barrier), and their pharmacokinetics and interaction with their targets at the relevant site. According to the mitochondrial cascade hypothesis, mitochondrial dysfunctions are primary events in AD disease contributing to downstream pathological molecular cascades accelerating disease progression (104). Thus, is it conceivable to stimulate mitophagy in healthy or at-risk persons to prevent AD development? Will a single mitophagy stimulating molecule be effective enough? Or, should we envision the administration of mitophagy stimulating drugs in combination with PE or CR lifestyle changes, or even in combination with well-known in-test strategies (i.e. monoclonal antibodies against A β ₁₋₄₂, pyroglutamate A β or pTau species)?

Table 1: Mitophagic failure molecular signatures in AD patient brains, fluids and cells

	Molecular modifications	Expected phenotypic manifestations	Refs
Hippocampus Braak stage II-III	<ul style="list-style-type: none"> ↑ TOMM20 protein ↑ mitochondrial mRNA 16S/MT-NRN2 ↑ PINK1 and PINK1₅₂ proteins ↔ Parkin protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Mitochondrial mass ↓ PINK1/Parkin activation 	Martín-Maestro <i>et al.</i> 2016
Hippocampus & frontal cortex Braak stage V-VI	<ul style="list-style-type: none"> ↑ TOMM20 protein ↑ mitochondrial mRNA 16S/MT-NRN2 ↔ PINK1 and PINK1₅₂ proteins ↑ Parkin protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Mitochondrial mass ↓ PINK1/Parkin activation 	
ND	<ul style="list-style-type: none"> ↓ PINK1 and Parkin mRNA 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ PINK1/Parkin activation 	
Hippocampus & frontal cortex Braak stage II-III & V-VI	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Cytosolic Parkin protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ PINK1/Parkin activation 	Ye <i>et al.</i> 2015
ND	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Number of damaged mitochondria ↑ Parkin protein ↔ p62, TOMM20 and HSP60 proteins ↑ Number of mitochondria in autophagic vesicles ↑ LC3-II/I protein ratio 	<ul style="list-style-type: none"> Parkin activation ↓ Lysosomal degradation ↑ Phagophore recruitment 	
Hippocampus & frontal cortex Braak stage V-VI	<ul style="list-style-type: none"> ↓ PINK1 mRNA and protein ↑ p-S65-Ub protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ PINK1/Parkin activation ↑ Mitochondria tagged for degradation 	Du <i>et al.</i> 2017 Watzlawik <i>et al.</i> 2020
	<ul style="list-style-type: none"> ↑ Number of damaged mitochondria 		Fang <i>et al.</i> 2019
ND	<ul style="list-style-type: none"> ↑ pT172 AMPK protein ↓ pS555 ULK1 and pS172 TBK1 proteins ↓ LC3-II protein ↓ TOMM20 – LAMP2 Colocalisation ↓ DISC1 protein ↓ NIX, BNIP3 and FUNDC1 mRNA ↓ OPTN, VDAC1 and VCP/p97 mRNA ↓ PINK1 and Parkin protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Mitophagic initiation ↓ Number of phagophores ↓ Mitolysosomes formation ↓ PINK1/Parkin-independent mitophagy ↓ PINK1/Parkin-dependent mitophagy ↓ PINK1/Parkin-independent mitophagy ↓ PINK1/Parkin activation 	Wang <i>et al.</i> 2019 Martín-Maestro <i>et al.</i> 2017
	<ul style="list-style-type: none"> ↑ p62 protein ↑ LC3-II/I protein ratio ↑ p-S65-Ub protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Lysosomal degradation ↑ Phagophore recruitment ↑ Mitochondria tagged for degradation 	Vaillant-Beuchot <i>et al.</i> 2020 Hou <i>et al.</i> 2020
Bearers of APOEε4 allele	<ul style="list-style-type: none"> ↓ FOXO3a protein ↑ pSer253 / tot FOXO3a ratio ↓ Bcl-1 and ATG12 proteins ↓ PINK1 protein ↓ p-S65-Ub protein ↔ p62 protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ FOXO3a activity ↓ Phagosomes formation ↓ PINK1/Parkin activation ↓ Lysosomal degradation 	Sohn <i>et al.</i> 2021
Plasma	<ul style="list-style-type: none"> ↑ PINK1 & LC3 mRNA ↓ Parkin mRNA 	<ul style="list-style-type: none"> PINK1/Parkin activation failure 	Pakpian <i>et al.</i> 2020
Serum	<ul style="list-style-type: none"> ↓ Parkin & ATG5 proteins 	<ul style="list-style-type: none"> PINK1/Parkin activation failure 	Castellazzi <i>et al.</i> 2019
SAD fibroblasts	<ul style="list-style-type: none"> ↑ TOMM20 protein ↓ Parkin protein ↓ Parkin & SCA1 colocalisation ↓ LAMP1 protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mitochondrial mass ↓ PINK1/Parkin activation ↓ Parkin recruitment to mitochondria ↓ lysosomes number 	Martín-Maestro <i>et al.</i> 2016

		<ul style="list-style-type: none"> ↑ mitochondria maturation ↓ PINK1 protein ↑ LC3-II/I ratio ↔ p62 protein & mitochondrial mass 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mitochondria maturation ↓ PINK1/Parkin activation ↑ Phagophores number ↓ Lysosomal degradation 	Drabik <i>et al.</i> 2021
PS1 (A246E) fibroblasts		<ul style="list-style-type: none"> ↑ TOMM20 protein ↑ Parkin protein ↑ Parkin & TOMM20 colocalisation ↑ LC3 & TOMM20 colocalisation ↓ lysosomes acidification 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mitochondrial mass ↑ PINK1/Parkin activation ↑ Parkin recruitment to mitochondria ↑ Phagophore recruitment ↓ Lysosomal degradation 	Martín-Maestro <i>et al.</i> 2017
PS1 (A246E) iPSC-differentiated neurons		<ul style="list-style-type: none"> ↑ TOMM20 protein ↑ PINK1 & Parkin proteins ↑ Parkin & TOMM20 colocalisation ↓ Pro-cathepsin B activation 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mitochondrial mass ↑ PINK1/Parkin activation ↑ Parkin recruitment to mitochondria ↓ Lysosomal degradation 	
APP (V717L) & APOE ϵ 4/ ϵ 4 iPSC-differentiated neurons		<ul style="list-style-type: none"> ↓ Bcl-1 protein & pS555 ULK1 and pS172 TBK1 proteins ↓ PINK1 protein ↓ AMBRA1, BCL2L13 & FUNDC1 proteins 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ mitophagy initiation ↓ PINK1/Parkin initiation ↓ PINK1/Parkin-independent mitophagy activation 	Fang <i>et al.</i> 2019
KI PS1 (M146L) iPSC-differentiated neural stem cells	neural	<ul style="list-style-type: none"> ↑ TOMM20 protein ↑ PINK1 & Parkin proteins ↑ Parkin & TOMM20 colocalisation ↓ LC3 & TOMM20 colocalisation ↓ TFEB & LAMP1 mRNA & proteins 	<ul style="list-style-type: none"> ↑ mitochondrial mass ↑ PINK1/Parkin activation ↑ Parkin recruitment to mitochondria ↓ Phagophore recruitment ↓ Lysosomal degradation 	Martín-Maestro <i>et al.</i> 2019
Neuronal cybrids		<ul style="list-style-type: none"> ↓ PINK1 protein 	<ul style="list-style-type: none"> ↓ PINK1/Parkin activation 	Du <i>et al.</i> 2021

Phenotype modifications and/or levels of mRNA or proteins are depicted as ↑ (increased), ↓ (decreased), or ↔ (unchanged) as compared to control individual (brain samples, blood, serum and cells). ND: not determined. iPSC: induced pluripotent stem cells. KI: knock in.

Table 2: Involvement of Tau, A β , APP-CTFs, and AD risk factors in mitophagy failure *in vitro* and *in vivo*

	Models	Molecular mechanisms	Expected/reported phenotypes	Refs	
Tau species					
NH₂hTau	I ^{ary} hippocampal neurons from rats	↓ TOMM20, VDAC1, TIMM23, CytC, ATPB & Mn-SODII proteins ↓ mitDNA (mtND2)/gDNA (Htert) ratio ↑ LC3-II protein ↑ PINK1 protein & ↑ Parkin protein in mitochondria ↓ p62 protein	↑ mitochondrial degradation ↑ phagophores number ↑ PINK1/Parkin activation ↑ Lysosomal degradation	Amadoro <i>et al.</i> 2014	
	Tg2576 mice (6 months)	↑ Parkin protein in mitochondria	↑ Parkin recruitment to mitochondria	Corsetti <i>et al.</i> 2015	
hTau	HEK293T cells	↑ TOMM20 & COX IV proteins ↑ mitDNA (Atp-6)/gDNA (Rpl13) ratio	↑ mitochondrial mass	Hu <i>et al.</i> 2016	
	Mice I ^{ary} hippo neurons	↑ LC3-II protein	↑ phagophores number		
hTau (P301L)	CA3, hTau mice (4 months)	↓ PINK1 & ↓ Parkin proteins in mitochondria ↑ p62 protein	↓ PINK1/Parkin activation ↓ Lysosomal degradation		
	N2a cells	↓ Parkin in mitochondria ↑ hTau (P301L)-Parkin interaction	↓ Parkin activation	Cummins <i>et al.</i> 2019	
hTau F3ΔK280	pR5 mice (14 months) <i>C. elegans</i>	↓ mitochondria ubiquitination ↓ Mitochondria degradation in mitolysosomes	↓ mitochondria tagged from degradation ↓ Lysosomal degradation		
	<i>C. elegans</i>	↓ LC3-BNIP3/NIX colocalization	↓ Phagophores recruitment	Fang <i>et al.</i> 2019	
hTau T231E & K274/281Q	<i>C. elegans</i>	↓ Mitolysosomes number	↓ Mitolysosomes formation	Guha <i>et al.</i> 2020	
Aβ species					
Aβ₁₋₄₂	PC12 cells (5 μ M, 24H)	↑ Bcl-1 & ↑ Parkin mRNA & protein ↑ LC3 protein & LC3-II/ I ratio	↑ mitophagy initiation ↑ Phagophores number	Wang <i>et al.</i> 2018	
	PC12 cells (7 μ M, 12H)	↓ Bcl-1 protein ↓ PINK1 & Parkin proteins ↓ LC3-II protein ↑ p62 protein	↓ mitophagy initiation ↓ PINK1/Parkin activation ↓ Phagophores number ↓ Lysosomal degradation	Wang <i>et al.</i> 2020	
	<i>C. elegans</i> (CL2355)	↓ LC3-BNIP3/NIX colocalization	↓ Phagophores recruitment	Fang <i>et al.</i> 2019	
	CA1 injected rats	↓ Bcl-1 protein	↓ mitophagy initiation	Han <i>et al.</i> 2020	
	Mouse I ^{ary} hippo neurons	↓ PINK1 & Parkin proteins ↑ p62 protein	↓ PINK1/Parkin activation ↓ Lysosomal degradation		
		↑ Bcl-1 protein ↑ LC3-II protein ↑ PINK1 & Parkin proteins ↑ Parkin protein in mitochondria ↓ Mitolysosomes number	↑ mitophagy initiation ↑ Phagophores number ↑ PINK1/Parkin activation ↓ mitophagy	Zhang <i>et al.</i> 2021	
oAβ₁₋₄₂	HEK293T cells	↑ mitochondria number ↑ Parkin protein in mitochondria ↑ LC3-II protein in mitochondria ↑ Mitophagosomes number ↑ p62 protein in mitochondria	Mitochondria accumulation Parkin activation ↑ Phagophores recruitment Mitophagosomes accumulation ↓ Lysosomal degradation	Wang <i>et al.</i> 2020	
	SK-N-BE cells Mouse I ^{ary} neurons	↑ Bcl-1 protein ↓ Bcl-1 & Bcl-2 protein complex ↑ LC3-II protein ↓ Autophagosomes number ↑ Autolysosomes number ↑ p62 protein ↓ Cathepsin D activity	↓ mitophagy initiation ↑ Phagophores number Autophagosomes accumulation ↓ Lysosomal degradation	Guglielmot <i>et al.</i> 2014	
APP-CTFs					

AICD	HEK293T	↑ PINK1 mRNA & protein	↑ PINK1/Parkin activation	Goiran <i>et al.</i> 2018
	SH-SY5Y	↑ LC3-II protein ↓ p62, TOMM20 & TIMM23 proteins	↑ Phagophores number ↑ Lysosomal degradation	
C99 and C83	SH-SY5Y APPswe treated with γ -secretase inhibitor	↑ LC3-II protein ↓ Mature cathepsin B protein ↓ Cathepsin B activity	↑ Phagophores number ↓ Lysosomal degradation	Lauritzen <i>et al.</i> 2016
	3xTgAD mice (APPswe, TauP301L & PS1 M146V) treated with γ -secretase inhibitor	↑ LC3-II protein ↑ Autophagic vesicles number	↑ Autophagic vesicles number	
	AAV-C99 mice	↑ p62 protein ↑ LAMP1 puncta number & size	↓ Lysosomal degradation Lysosomal failure	
	AAV-C99 mice treated with γ -secretase inhibitor	↑ LC3-II protein	↑ Phagophores number	
		↑ Cathepsin B puncta number & size	Lysosomal failure	
	SH-SY5Y APPswe	↑ PINK1 & Parkin protein in mitochondria ↑ LC3-II protein in mitochondria ↑ HSP60- LC3 colocalization ↓ mitochondria-LAMP1 colocalization ↔ p62 protein in mitochondria ↑ TOMM20, TIMM23, HSP60 & HSP10 proteins in mitochondria	↑ PINK1/Parkin activation ↑ Phagophores number ↑ Mitophagosomes number ↓ Mitolysosomes number ↓ Lysosomal degradation	Vaillant-Beuchot <i>et al.</i> 2020
	SH-SY5Y APPswe treated with γ -secretase inhibitor	↑ Mitochondria number with damaged cristae ↔ PINK1 & Parkin protein in mitochondria ↑ LC3-II / I protein ratio in mitochondria ↔ Cells number containing mitolysosomes	Damaged mitochondria accumulation ↓ PINK1/Parkin activation ↑ Phagophores number ↔ Mitolysosomes number	
	SH-SY5Y C99	↔ PINK1 & Parkin proteins in mitochondria ↔ LC3-II / I protein ratio in mitochondria ↑ p62, TOMM20 & HSP10 proteins in mitochondria	↓ PINK1/Parkin activation ↔ Phagophores number ↓ Lysosomal degradation	
	AAV-C99 mice	↔ LC3-II protein in mitochondria ↔ p62, TOMM20 & HSP10 proteins in mitochondria	↔ Phagophores number ↓ Lysosomal degradation	
	Young 3xTgAD mice (APPswe, TauP301L & PS1 M146V) treated with γ -secretase inhibitor	↑ mitochondria with damaged cristae ↔ PINK1 protein in mitochondria ↑ LC3-II / I protein ratio in mitochondria ↔ p62 protein in mitochondria ↑ TIMM23 & HSP10 proteins in mitochondria	Damaged mitochondria accumulation ↓ PINK1/Parkin activation Phagophores number ↓ Lysosomal degradation	
Old 3xTgAD mice (APPswe, TauP301L & PS1 M146V)	↑ mitochondria with damaged cristae ↑ PINK1 protein in mitochondria ↑ LC3-II / I protein ratio in mitochondria ↓ p62 & TIMM23 proteins in mitochondria	Damaged mitochondria accumulation ↑ PINK1/Parkin activation ↑ Phagophores number ↑ Lysosomal degradation		
Risk factors				

APOE4	T98G cells	↑ TOMM5, ATP5B, CS & SDHA aggregation	Mitochondria accumulation	Parcon <i>et al.</i> 2018
		Competition for TFEB CLEAR motif ↓ MAP1LC3B, p62/SQSTM1 & LAMP2 transcription	↓ expression of mitophagy actors	
	Hippocampus from hAPOE ϵ 4/ ϵ 4 mice	↑ TOMM40 & COX I proteins ↑ mitochondrial length ↓ mitochondria cristae density	Damaged mitochondria accumulation	Simonovich <i>et al.</i> 2019
		↓ PINK1 ₅₂ protein ↑ Parkin protein ↑ p62 protein	↑ PINK1/Parkin activation	
	Astrocytes from hAPOE ϵ 4/ ϵ 4 mice	↑ TOMM40 & TOMM20 proteins ↑ PINK1 & ↓ PINK1 ₅₂ proteins ↑ Parkin mRNA & protein in mitochondria	↓ Lysosomal degradation ↑ Mitochondria number ↑ PINK1/Parkin activation	Schmukler <i>et al.</i> 2020
	↑ Ubiquitinated Parkin ↓ LC3-II / I protein ratio in mitochondria ↓ Mito-GFP-LC3 colocalization ↓ Mitolysosomes number	↓ Parkin activity Mitophagosomes accumulation and/or reduced lysosomal degradation		
	↔ p62 protein in mitochondria ↑ Ubiquitin protein in mitochondria	↓ Lysosomal degradation		
High cholesterol	SH-SY5Y cells treated with oA β ₁₋₄₂	↑ CYC- LC3-II colocalization	↑ Mitophagosomes number	Roca-Agüjetas <i>et al.</i> 2021
		↓ CYC-LAMP2 colocalization ↑ mitDNA copy number ↑ poly-Ubiquitinated K63 protein in mitochondria	↓ Mitolysosomes number Damaged mitochondria accumulation	
	APP/PS1 SREBF2 mice,	↑ PINK1 & Parkin proteins in mitochondria ↑ Phosphorylated PINK1 protein in mitochondria ↓ OPTN translocation to mitochondria	↑ PINK1/Parkin activation ↓ Phagophore recruitment	

Phenotype modifications and/or levels of proteins are depicted as ↑ (increased), ↓ (decreased), or ↔ (unchanged) as compared to respective control models. $\Delta\Psi_m$: mitochondrial membrane potential. CA3: cornu ammonis. *C. elegans*: *Caenorhabditis elegans*. oA β : oligomeric β amyloid peptide. mA β : monomeric β amyloid peptide. I^{ary}: primary. hippo: hippocampal. mitDNA: mitochondrial DNA. gDNA: genomic DNA.

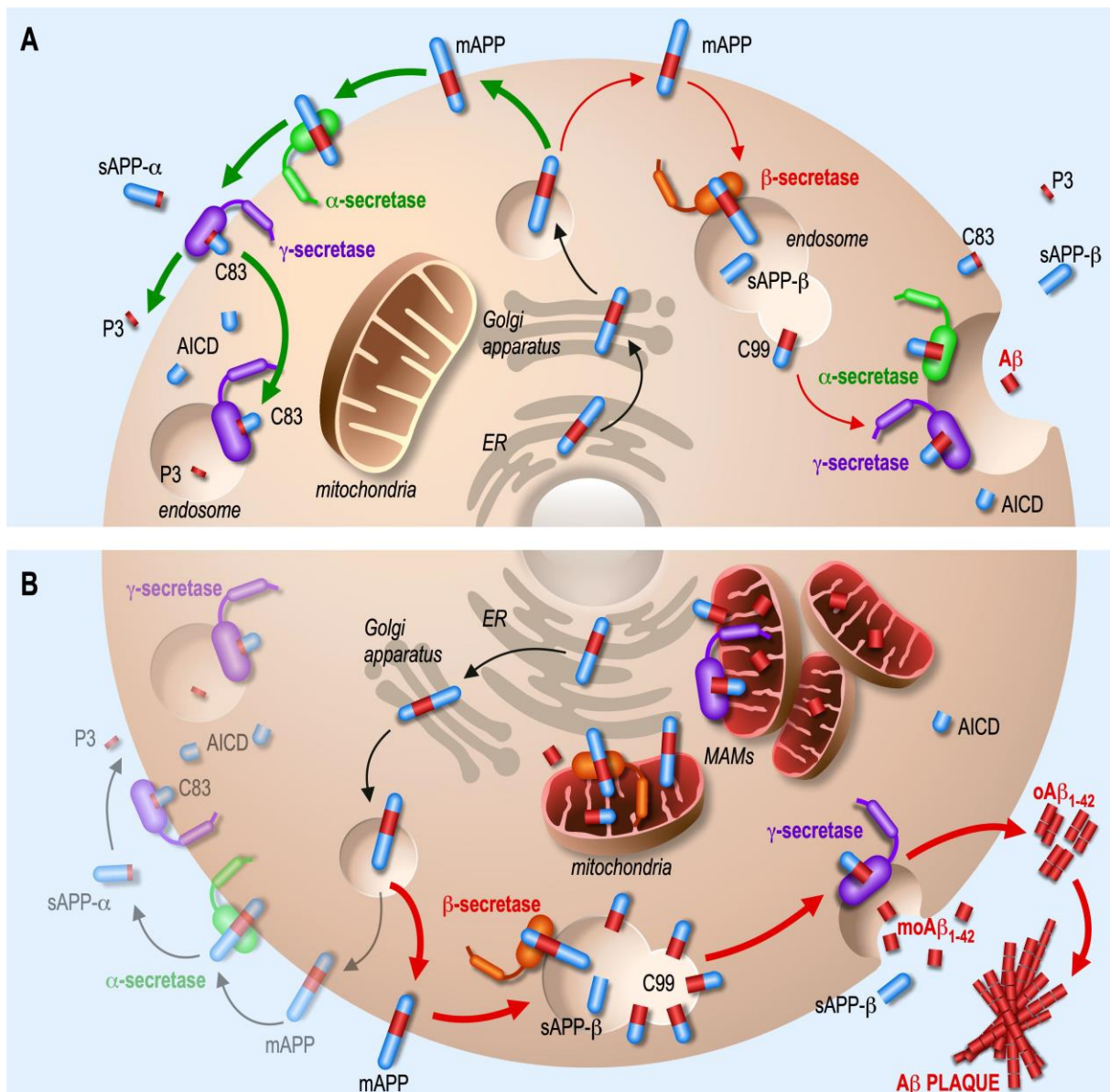


Figure 1: Amyloidogenic and non-amyloidogenic processing of APP. The amyloid precursor protein (APP) is synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and passes through the Golgi apparatus where it undergoes several post-translational modifications such as N- and O-glycosylations, sialylations, phosphorylations and sulfatations before reaching the plasma membrane (PM) in its mature form (mAPP). There, APP can be processed into two different pathways. **A.** In physiological conditions, APP mainly follows the non-amyloidogenic pathway (green arrows), where it is cleaved by the α -secretase, producing secreted sAPP α fragment and membrane-anchored APP-CTF- α (C83), which is then cleaved by the γ -secretase generating secreted P3 fragment and APP intracellular domain (AICD) fragment. Under physiological conditions, APP is also marginally processed in the amyloidogenic pathway (red arrows), in which it is first internalized in endosomes and cleaved by the β -secretase generating sAPP β fragment and membrane-anchored APP-CTF- β (C99). This later is subsequently cleaved by the γ -secretase to generate A β and AICD (APP intracellular domain), or by the α -secretase to generate the C83 peptide. **B.** In Alzheimer's disease (AD), APP is mostly processed in the amyloidogenic pathway. It also accumulates and is processed in the intracellular compartments including the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria-associated membranes (MAMs), where secretases are also present. Secreted monomeric A β_{1-42} (moA β_{1-42}) peptide is prone to oligomerize (oA β_{1-42}) and generates extracellular amyloid plaques.

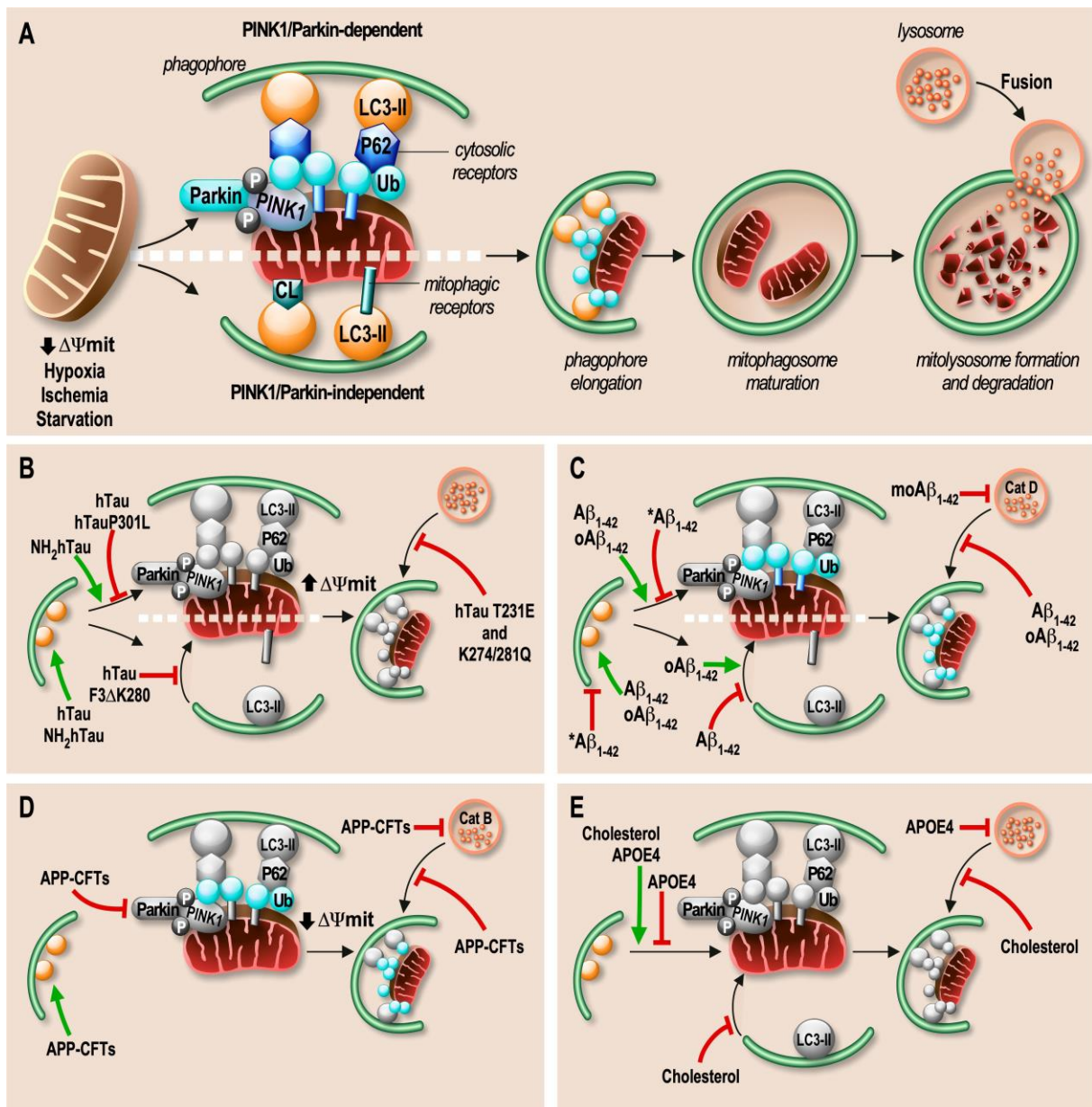


Figure 2: Physiological mitophagy processes and alterations linked to Tau, A β , APP-CTFs and APOE. **A.** Following mitochondrial stress (i.e. mitochondria membrane ($\Delta\Psi_{mit}$) depolarization, or a general cellular stress (i.e. hypoxia, ischemia, starvation)), mitochondria undergo a specific degradation mechanism by mitophagy. The PINK1/Parkin-dependent mitophagy is driven by a decrease of $\Delta\Psi_{mit}$, triggering the stabilization of PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) at the OMM and the recruitment of the E3 Ubiquitin ligase Parkin, generating poly-phospho-ubiquitinated chains (p-S65-Ub) on OMM proteins that act as a “eat-me” signal for damaged mitochondria. Cytosolic receptors (p62, OPTN, NDP52, NBR1, or TAX1BP1) will recognize and bind to p-S65-Ub decorated proteins and will recruit the phagosome through their interaction, via their LIR motif with LC3-II (the activated form of the microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3) present at the surface of the phagosome. Besides, in the PINK1/Parkin-independent mitophagy, the phagosome is recruited around mitochondria directly through LIR motif-containing OMM receptors (NIX/BNIP3L, BNIP3, FUNDC1, BCL2L13, FKBP8, DISC1, AMBRA1, or MCL-1) or through the recognition of cardiolipin (CL) exposed on the OMM. Once the phagophore is recruited, it engulfs damaged mitochondria to generate the mitophagosome. Then, lysosomes can fuse with mitophagosomes to form mitolysosomes and degrade damaged mitochondria by acidic hydrolases. **B-E.** Mitophagic process is perturbed in AD by Tau species (**B**), A β species (**C**), APP-CTFs (**D**), and APOE4 isoform and/or high cholesterol levels (**E**). Proteins that are impacted in mitophagy process failure are depicted in red. Inhibitory functions are indicated in red arrows, and PINK1/Parkin activation or phagophore formation is indicated by green arrows.

Acknowledgements

This work was supported by Inserm (MC, and FC), Fondation Vaincre Alzheimer (grant # FR18-035) (MC), LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease) (FC). We acknowledge PhD fellow support from DISTALZ to AM.

Author Contributions

AM wrote the first version of the review. AM and FE prepared the figures and tables. MC wrote and edited the review. We thank FC for critical reading and edition of the last version of the review, and Franck Aguila for figure drawing.

References

1. De Strooper B, Karran E. The Cellular Phase of Alzheimer's Disease. *Cell*. 2016;164(4):603-15.
2. Masters CL, Bateman R, Blennow K, Rowe CC, Sperling RA, Cummings JL. Alzheimer's disease. *Nature reviews Disease primers*. 2015;1:15056.
3. Hampel H, Hardy J, Blennow K, Chen C, Perry G, Kim SH, et al. The Amyloid- β Pathway in Alzheimer's Disease. *Molecular psychiatry*. 2021.
4. Nhan HS, Chiang K, Koo EH. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: friends and foes. *Acta Neuropathol*. 2015;129(1):1-19.
5. Hirai K, Aliev G, Nunomura A, Fujioka H, Russell RL, Atwood CS, et al. Mitochondrial abnormalities in Alzheimer's disease. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. 2001;21(9):3017-23.
6. Hu Y, Li X-C, Wang Z-h, Luo Y, Zhang X, Liu X-P, et al. Tau accumulation impairs mitophagy via increasing mitochondrial membrane potential and reducing mitochondrial Parkin. *Oncotarget*. 2016;7(14):17356-68.
7. Martín-Maestro P, Gargini R, Perry G, Avila J, García-Escudero V. PARK2 enhancement is able to compensate mitophagy alterations found in sporadic Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*. 2016;25(4):792-806.
8. Du F, Yu Q, Yan S, Hu G, Lue L-F, Walker DG, et al. PINK1 signalling rescues amyloid pathology and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Brain: A Journal of Neurology*. 2017;140(12):3233-51.
9. Martín-Maestro P, Gargini R, García E, Perry G, Avila J, García-Escudero V. Slower Dynamics and Aged Mitochondria in Sporadic Alzheimer's Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2017;2017:1-14.
10. Sohn HY, Kim SI, Park JY, Park SH, Koh YH, Kim J, et al. ApoE4 attenuates autophagy via FoxO3a repression in the brain. *Sci Rep*. 2021;11(1):17604.
11. Fang EF, Hou Y, Palikaras K, Adriaanse BA, Kerr JS, Yang B, et al. Mitophagy inhibits amyloid- β and tau pathology and reverses cognitive deficits in models of Alzheimer's disease. *Nature Neuroscience*. 2019;22(3):401-12.
12. Ye X, Sun X, Starovoytov V, Cai Q. Parkin-mediated mitophagy in mutant hAPP neurons and Alzheimer's disease patient brains. *Hum Mol Genet*. 2015;24(10):2938-51.
13. Vaillant-Beuchot L, Mary A, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Lauritzen I, Eysert F, et al. Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains. *Acta Neuropathologica*. 2020.
14. Wang Z-T, Lu M-H, Zhang Y, Ji W-L, Lei L, Wang W, et al. Disrupted-in-schizophrenia-1 protects synaptic plasticity in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease as a mitophagy receptor. *Aging Cell*. 2019;18(1):e12860.
15. Drabik K, Malińska D, Piecyk K, Dębska-Vielhaber G, Vielhaber S, Duszyński J, et al. Effect of Chronic Stress Present in Fibroblasts Derived from Patients with a Sporadic Form of AD on Mitochondrial Function and Mitochondrial Turnover. *Antioxidants (Basel, Switzerland)*. 2021;10(6).
16. Martín-Maestro P, Gargini R, A. Sproul A, García E, Antón LC, Noggle S, et al. Mitophagy Failure in Fibroblasts and iPSC-Derived Neurons of Alzheimer's Disease-Associated Presenilin 1 Mutation. *Frontiers in Molecular Neuroscience*. 2017;10.
17. Lee JH, Yu WH, Kumar A, Lee S, Mohan PS, Peterhoff CM, et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell*. 2010;141(7):1146-58.
18. Coffey EE, Beckel JM, Laties AM, Mitchell CH. Lysosomal alkalization and dysfunction in human fibroblasts with the Alzheimer's disease-linked presenilin 1 A246E mutation can be reversed with cAMP. *Neuroscience*. 2014;263:111-24.
19. Martín-Maestro P, Sproul A, Martinez H, Paquet D, Gerges M, Noggle S, et al. Autophagy Induction by Bexarotene Promotes Mitophagy in Presenilin 1 Familial Alzheimer's Disease iPSC-Derived Neural Stem Cells. *Molecular Neurobiology*. 2019;56(12):8220-36.

20. Du F, Yu Q, Yan SS. PINK1 Activation Attenuates Impaired Neuronal-Like Differentiation and Synaptogenesis and Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease Trans-Mitochondrial Cybrid Cells. *J Alzheimers Dis.* 2021;81(4):1749-61.
21. Castellazzi M, Patergnani S, Donadio M, Giorgi C, Bonora M, Bosi C, et al. Autophagy and mitophagy biomarkers are reduced in sera of patients with Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Scientific Reports.* 2019;9.
22. Pakpian N, Phopin K, Kitidee K, Govitrapong P, Wongchitrat P. Alterations in mitochondrial dynamic-related genes in the peripheral blood of Alzheimer's disease patients. *Current Alzheimer Research.* 2020.
23. Watzlawik JO, Hou X, Fricova D, Ramnarine C, Barodia SK, Gendron TF, et al. Sensitive ELISA-based detection method for the mitophagy marker p-S65-Ub in human cells, autopsy brain, and blood samples. *Autophagy.* 2020:1-16.
24. Amadoro G, Corsetti V, Florenzano F, Atlante A, Ciotti MT, Mongiardi MP, et al. AD-linked, toxic NH2 human tau affects the quality control of mitochondria in neurons. *Neurobiology of Disease.* 2014;62:489-507.
25. Corsetti V, Florenzano F, Atlante A, Bobba A, Ciotti MT, Natale F, et al. NH2-truncated human tau induces deregulated mitophagy in neurons by aberrant recruitment of Parkin and UCHL-1: implications in Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics.* 2015;24(11):3058-81.
26. Cummins N, Tweedie A, Zuryn S, Bertran-Gonzalez J, Götz J. Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria. *The EMBO journal.* 2019;38(3).
27. Guha S, Fischer S, Johnson GVW, Nehrke K. Tauopathy-associated tau modifications selectively impact neurodegeneration and mitophagy in a novel *C. elegans* single-copy transgenic model. *Molecular Neurodegeneration.* 2020;15(1):65.
28. Wang N, Wang H, Li L, Li Y, Zhang R. β -Asarone Inhibits Amyloid- β by Promoting Autophagy in a Cell Model of Alzheimer's Disease. *Frontiers in Pharmacology.* 2020;10.
29. Wang H, Jiang T, Li W, Gao N, Zhang T. Resveratrol attenuates oxidative damage through activating mitophagy in an in vitro model of Alzheimer's disease. *Toxicology Letters.* 2018;282:100-8.
30. Zhang L, Fang Y, Zhao X, Zheng Y, Ma Y, Li S, et al. miR-204 silencing reduces mitochondrial autophagy and ROS production in a murine AD model via the TRPML1-activated STAT3 pathway. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2021;24:822-31.
31. Wang H, Zhang T, Ge X, Chen J, Zhao Y, Fu J. Parkin overexpression attenuates A β -induced mitochondrial dysfunction in HEK293 cells by restoring impaired mitophagy. *Life Sciences.* 2020;244:117322.
32. Han Y, Wang N, Kang J, Fang Y. β -Asarone improves learning and memory in A β 1-42-induced Alzheimer's disease rats by regulating PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Metabolic Brain Disease.* 2020.
33. Tammineni P, Ye X, Feng T, Aikal D, Cai Q. Impaired retrograde transport of axonal autophagosomes contributes to autophagic stress in Alzheimer's disease neurons. *eLife.* 2017;6.
34. Guglielmotto M, Monteleone D, Piras A, Valsecchi V, Tropiano M, Ariano S, et al. A β 1-42 monomers or oligomers have different effects on autophagy and apoptosis. *Autophagy.* 2014;10(10):1827-43.
35. Pardossi-Piquard R, Checler F. The physiology of the β -amyloid precursor protein intracellular domain AICD. *Journal of neurochemistry.* 2012;120 Suppl 1:109-24.
36. Goiran T, Duplan E, Chami M, Bourgeois A, El Manaa W, Rouland L, et al. β -Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Controls Mitochondrial Function by Modulating Phosphatase and Tensin Homolog-Induced Kinase 1 Transcription in Cells and in Alzheimer Mice Models. *Biological Psychiatry.* 2018;83(5):416-27.
37. Duplan E, Sevalle J, Viotti J, Goiran T, Bauer C, Renbaum P, et al. Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription. *Journal of molecular cell biology.* 2013;5(2):132-42.
38. Checler F, Afram E, Pardossi-Piquard R, Lauritzen I. Is γ -secretase a beneficial inactivating enzyme of the toxic APP C-terminal fragment C99? *J Biol Chem.* 2021;296:100489.
39. Pulina MV, Hopkins M, Haroutunian V, Greengard P, Bustos V. C99 selectively accumulates in vulnerable neurons in Alzheimer's disease. *Alzheimer's & dementia : the journal of the Alzheimer's Association.* 2020;16(2):273-82.

40. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi M-G, Barkats M, et al. Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathologica*. 2016;132:257-76.
41. Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bauer C, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, et al. The beta-secretase-derived C-terminal fragment of betaAPP, C99, but not Abeta, is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J Neurosci*. 2012;32(46):16243-1655a.
42. Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, Bauer C, Checler F, Pardossi-Piquard R. Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3 \times TgAD and 2 \times TgAD mice. *Neurobiol Aging*. 2018;71:21-31.
43. Hung COY, Livesey FJ. Altered γ -Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease. *Cell reports*. 2018;25(13):3647-60.e2.
44. Kwart D, Gregg A, Scheckel C, Murphy EA, Paquet D, Duffield M, et al. A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP β -CTFs, Not A β . *Neuron*. 2019;104(2):256-70.e5.
45. Del Prete D, Suski JM, Oulès B, Debayle D, Gay AS, Lacas-Gervais S, et al. Localization and Processing of the Amyloid- β Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes. *Journal of Alzheimer's Disease*. 2017;55(4):1549-70.
46. Pera M, Larrea D, Guardia-Laguarta C, Montesinos J, Velasco KR, Agrawal RR, et al. Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *The EMBO Journal*. 2017;36(22):3356-71.
47. Montesinos J, Pera M, Larrea D, Guardia-Laguarta C, Agrawal RR, Velasco KR, et al. The Alzheimer's disease-associated C99 fragment of APP regulates cellular cholesterol trafficking. *Embo j*. 2020;39(20):e103791.
48. Yang M, Li C, Yang S, Xiao Y, Xiong X, Chen W, et al. Mitochondria-Associated ER Membranes - The Origin Site of Autophagy. *Front Cell Dev Biol*. 2020;8:595.
49. Gelmetti V, De Rosa P, Torosantucci L, Marini ES, Romagnoli A, Di Rienzo M, et al. PINK1 and BECN1 relocate at mitochondria-associated membranes during mitophagy and promote ER-mitochondria tethering and autophagosome formation. *Autophagy*. 2017;13(4):654-69.
50. McLelland GL, Goiran T, Yi W, Dorval G, Chen CX, Lauinger ND, et al. Mfn2 ubiquitination by PINK1/parkin gates the p97-dependent release of ER from mitochondria to drive mitophagy. *Elife*. 2018;7.
51. Area-Gomez E, Del Carmen Lara Castillo M, Tambini MD, Guardia-Laguarta C, de Groof AJ, Madra M, et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J*. 2012;31(21):4106-23.
52. Parcon PA, Balasubramaniam M, Ayyadevara S, Jones RA, Liu L, Shmookler Reis RJ, et al. Apolipoprotein E4 inhibits autophagy gene products through direct, specific binding to CLEAR motifs. *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association*. 2018;14(2):230-42.
53. Lefterov I, Wolfe CM, Fitz NF, Nam KN, Letronne F, Biedrzycki RJ, et al. APOE2 orchestrated differences in transcriptomic and lipidomic profiles of postmortem AD brain. *Alzheimers Res Ther*. 2019;11(1):113.
54. Simonovitch S, Schmukler E, Masliah E, Pinkas-Kramarski R, Michaelson DM. The Effects of APOE4 on Mitochondrial Dynamics and Proteins in vivo. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2019;70(3):861-75.
55. Schmukler E, Solomon S, Simonovitch S, Goldshmit Y, Wolfson E, Michaelson DM, et al. Altered mitochondrial dynamics and function in APOE4-expressing astrocytes. *Cell Death & Disease*. 2020;11(7).
56. Lee SI, Jeong W, Lim H, Cho S, Lee H, Jang Y, et al. APOE4-carrying human astrocytes oversupply cholesterol to promote neuronal lipid raft expansion and A β generation. *Stem cell reports*. 2021.
57. Roca-Agujetas V, Barbero-Camps E, de Dios C, Podlesniy P, Abadin X, Morales A, et al. Cholesterol alters mitophagy by impairing optineurin recruitment and lysosomal clearance in Alzheimer's disease. *Mol Neurodegener*. 2021;16(1):15.
58. Han S, Jeong YY, Sheshadri P, Su X, Cai Q. Mitophagy regulates integrity of mitochondria at synapses and is critical for synaptic maintenance. *EMBO reports*. 2020:e201949801.

59. Zheng YR, Zhang XN, Chen Z. Mitochondrial transport serves as a mitochondrial quality control strategy in axons: Implications for central nervous system disorders. *CNS Neurosci Ther.* 2019;25(7):876-86.
60. Safiulina D, Kuum M, Choubey V, Gogichaishvili N, Liiv J, Hickey MA, et al. Miro proteins prime mitochondria for Parkin translocation and mitophagy. *The EMBO journal.* 2019;38(2).
61. Kam MK, Lee DG, Kim B, Huh J-W, Lee HJ, Park Y-H, et al. Amyloid-beta oligomers induce Parkin-mediated mitophagy by reducing Miro1. *The Biochemical Journal.* 2020.
62. Ryu D, Mouchiroud L, Andreux PA, Katsyuba E, Moullan N, Nicolet-Dit-Félix AA, et al. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nature Medicine.* 2016;22(8):879-88.
63. Andreux PA, Blanco-Bose W, Ryu D, Burdet F, Ibberson M, Aebischer P, et al. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab.* 2019;1(6):595-603.
64. Aman Y, Frank J, Lautrup SH, Matysek A, Niu Z, Yang G, et al. The NAD(+)-mitophagy axis in healthy longevity and in artificial intelligence-based clinical applications. *Mechanisms of ageing and development.* 2020;185:111194.
65. Sorrentino V, Romani M, Mouchiroud L, Beck JS, Zhang H, D'Amico D, et al. Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature.* 2017;552(7684):187-93.
66. Phelan MJ. Phase II Clinical Trial of Nicotinamide for the Treatment of Mild to Moderate Alzheimer's Disease. *Journal of Geriatric Medicine and Gerontology.* 2017;3(1).
67. Tang Q, Zheng G, Feng Z, Chen Y, Lou Y, Wang C, et al. Trehalose ameliorates oxidative stress-mediated mitochondrial dysfunction and ER stress via selective autophagy stimulation and autophagic flux restoration in osteoarthritis development. *Cell Death & Disease.* 2017;8(10):e3081-e.
68. Zhu L, Yuan Y, Yuan L, Li L, Liu F, Liu J, et al. Activation of TFEB-mediated autophagy by trehalose attenuates mitochondrial dysfunction in cisplatin-induced acute kidney injury. *Theranostics.* 2020;10(13):5829-44.
69. Khalifeh M, Read MI, Barreto GE, Sahebkar A. Trehalose against Alzheimer's Disease: Insights into a Potential Therapy. *BioEssays.* 2020;42(8):1900195.
70. Rege SD, Geetha T, Griffin GD, Broderick TL, Babu JR. Neuroprotective effects of resveratrol in Alzheimer disease pathology. *Frontiers in Aging Neuroscience.* 2014;6.
71. Porquet D, Griñán-Ferré C, Ferrer I, Camins A, Sanfeliu C, Del Valle J, et al. Neuroprotective role of trans-resveratrol in a murine model of familial Alzheimer's disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD.* 2014;42(4):1209-20.
72. Chimento A, De Amicis F, Sirianni R, Sinicropi MS, Puoci F, Casaburi I, et al. Progress to Improve Oral Bioavailability and Beneficial Effects of Resveratrol. *International Journal of Molecular Sciences.* 2019;20(6).
73. Cramer PE, Cirrito JR, Wesson DW, Lee CYD, Karlo JC, Zinn AE, et al. ApoE-directed therapeutics rapidly clear β -amyloid and reverse deficits in AD mouse models. *Science (New York, NY).* 2012;335(6075):1503-6.
74. Pierrot N, Lhommel R, Quenon L, Hanseeuw B, Dricot L, Sindic C, et al. Targretin Improves Cognitive and Biological Markers in a Patient with Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD.* 2016;49(2):271-6.
75. Zhang L, Chen J. Biological Effects of Tetrahydroxystilbene Glucoside: An Active Component of a Rhizome Extracted from *Polygonum multiflorum*. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity.* 2018;2018.
76. Gao Y, Li J, Li J, Hu C, Zhang L, Yan J, et al. Tetrahydroxy stilbene glycoside alleviated inflammatory damage by mitophagy via AMPK related PINK1/Parkin signaling pathway. *Biochemical Pharmacology.* 2020;177:113997.
77. Deng M, Huang L, Zhong X. β -asarone modulates Beclin-1, LC3 and p62 expression to attenuate A β 40 and A β 42 levels in APP/PS1 transgenic mice with Alzheimer's disease. *Molecular Medicine Reports.* 2020;21(5):2095-102.
78. Sun C, Qiu X, Wang Y, Liu J, Li Q, Jiang H, et al. Long-term oral melatonin alleviates memory deficits, reduces amyloid- β deposition associated with downregulation of BACE1 and mitophagy in APP/PS1 transgenic mice. *Neuroscience Letters.* 2020;735:135192.

79. Morselli E, Mariño G, Bennetzen MV, Eisenberg T, Megalou E, Schroeder S, et al. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *The Journal of Cell Biology*. 2011;192(4):615-29.
80. Eisenberg T, Knauer H, Schauer A, Büttner S, Ruckenstuhl C, Carmona-Gutierrez D, et al. Induction of autophagy by spermidine promotes longevity. *Nature Cell Biology*. 2009;11(11):1305-14.
81. Qi Y, Qiu Q, Gu X, Tian Y, Zhang Y. ATM mediates spermidine-induced mitophagy via PINK1 and Parkin regulation in human fibroblasts. *Scientific Reports*. 2016;6(1):24700.
82. Yang X, Zhang M, Dai Y, Sun Y, Aman Y, Xu Y, et al. Spermidine inhibits neurodegeneration and delays aging via the PINK1-PDR1-dependent mitophagy pathway in *C. elegans*. *Aging*. 2020;12(17):16852-66.
83. Wirth M, Benson G, Schwarz C, Köbe T, Grittner U, Schmitz D, et al. The effect of spermidine on memory performance in older adults at risk for dementia: A randomized controlled trial. *Cortex*. 2018;109:181-8.
84. Cen X, Chen Y, Xu X, Wu R, He F, Zhao Q, et al. Pharmacological targeting of MCL-1 promotes mitophagy and improves disease pathologies in an Alzheimer's disease mouse model. *Nature Communications*. 2020;11(1):5731.
85. Song YM, Lee WK, Lee YH, Kang ES, Cha BS, Lee BW. Metformin Restores Parkin-Mediated Mitophagy, Suppressed by Cytosolic p53. *Int J Mol Sci*. 2016;17(1).
86. Bhansali S, Bhansali A, Dhawan V. Metformin promotes mitophagy in mononuclear cells: a potential in vitro model for unraveling metformin's mechanism of action. *Ann N Y Acad Sci*. 2020;1463(1):23-36.
87. Bharath LP, Agrawal M, McCambridge G, Nicholas DA, Hasturk H, Liu J, et al. Metformin Enhances Autophagy and Normalizes Mitochondrial Function to Alleviate Aging-Associated Inflammation. *Cell Metab*. 2020;32(1):44-55 e6.
88. Chen JL, Luo C, Pu D, Zhang GQ, Zhao YX, Sun Y, et al. Metformin attenuates diabetes-induced tau hyperphosphorylation in vitro and in vivo by enhancing autophagic clearance. *Exp Neurol*. 2019;311:44-56.
89. Kickstein E, Krauss S, Thornhill P, Rutschow D, Zeller R, Sharkey J, et al. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010;107(50):21830-5.
90. Ou Z, Kong X, Sun X, He X, Zhang L, Gong Z, et al. Metformin treatment prevents amyloid plaque deposition and memory impairment in APP/PS1 mice. *Brain Behav Immun*. 2018;69:351-63.
91. Koenig AM, Mechanic-Hamilton D, Xie SX, Combs MF, Cappola AR, Xie L, et al. Effects of the Insulin Sensitizer Metformin in Alzheimer Disease: Pilot Data From a Randomized Placebo-controlled Crossover Study. *Alzheimer Dis Assoc Disord*. 2017;31(2):107-13.
92. Lee HJ, Seo HI, Cha HY, Yang YJ, Kwon SH, Yang SJ. Diabetes and Alzheimer's Disease: Mechanisms and Nutritional Aspects. *Clinical nutrition research*. 2018;7(4):229-40.
93. Chin-Hsiao T. Metformin and the Risk of Dementia in Type 2 Diabetes Patients. *Aging Dis*. 2019;10(1):37-48.
94. Campbell JM, Stephenson MD, de Courten B, Chapman I, Bellman SM, Aromataris E. Metformin Use Associated with Reduced Risk of Dementia in Patients with Diabetes: A Systematic Review and Meta-Analysis. *J Alzheimers Dis*. 2018;65(4):1225-36.
95. McGurran H, Glenn JM, Madero EN, Bott NT. Prevention and Treatment of Alzheimer's Disease: Biological Mechanisms of Exercise. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2019;69(2):311-38.
96. Revilla S, Suñol C, García-Mesa Y, Giménez-Llort L, Sanfeliu C, Cristòfol R. Physical exercise improves synaptic dysfunction and recovers the loss of survival factors in 3xTg-AD mouse brain. *Neuropharmacology*. 2014;81:55-63.
97. Koo J-H, Kang E-B, Oh Y-S, Yang D-S, Cho J-Y. Treadmill exercise decreases amyloid- β burden possibly via activation of SIRT-1 signaling in a mouse model of Alzheimer's disease. *Experimental Neurology*. 2017;288:142-52.
98. Zhao N, Xia J, Xu B. Physical exercise may exert its therapeutic influence on Alzheimer's disease through the reversal of mitochondrial dysfunction via SIRT1-FOXO1/3-PINK1-Parkin-mediated mitophagy. *Journal of Sport and Health Science*. 2020.

99. Zhao N, Yan Q-W, Xia J, Zhang X-L, Li B-X, Yin L-Y, et al. Treadmill Exercise Attenuates A β -Induced Mitochondrial Dysfunction and Enhances Mitophagy Activity in APP/PS1 Transgenic Mice. *Neurochemical Research*. 2020;45(5):1202-14.
100. Mehrabani S, Bagherniya M, Askari G, Read MI, Sahebkar A. The effect of fasting or calorie restriction on mitophagy induction: a literature review. *J Cachexia Sarcopenia Muscle*. 2020;11(6):1447-58.
101. Qin W, Yang T, Ho L, Zhao Z, Wang J, Chen L, et al. Neuronal SIRT1 activation as a novel mechanism underlying the prevention of Alzheimer disease amyloid neuropathology by calorie restriction. *J Biol Chem*. 2006;281(31):21745-54.
102. Schafer MJ, Alldred MJ, Lee SH, Calhoun ME, Petkova E, Mathews PM, et al. Reduction of beta-amyloid and gamma-secretase by calorie restriction in female Tg2576 mice. *Neurobiol Aging*. 2015;36(3):1293-302.
103. Halagappa VK, Guo Z, Pearson M, Matsuoka Y, Cutler RG, Laferla FM, et al. Intermittent fasting and caloric restriction ameliorate age-related behavioral deficits in the triple-transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol Dis*. 2007;26(1):212-20.
104. Swerdlow RH. Mitochondria and Mitochondrial Cascades in Alzheimer's Disease. *Journal of Alzheimer's disease: JAD*. 2018;62(3):1403-16.

Annexe 3

Article : « La surexpression de l'isoforme tronquée de la Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 1 joue un rôle pathogénique dans la maladie d'Alzheimer. »

Upregulation of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 1 Truncated Isoform Plays a Pathogenic Role in Alzheimer's Disease.

Renaud Bussiere, Bénédicte Oulès, **Arnaud Mary**, Loan Vaillant-Beuchot, Cécile Martin, Wejdane El Manaa, Déborah Vallée, Eric Duplan, Patrizia Paterlini-Bréchet, Cristine Alves Da Costa, Frédéric Checler, Mounia Chami.

Cells





2019 Nov 28;8(12):1539. doi: 10.3390/cells8121539.

<https://doi.org/10.3390/cells8121539>

- *Cet article analyse l'implication de la forme tronquée de SERCA1 dans le stress du réticulum, la production d'APP-CTFs et la neuroinflammation dans des modèles cellulaires, murins et des cerveaux de patients sporadiques.*

Article

Upregulation of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Calcium ATPase 1 Truncated Isoform Plays a Pathogenic Role in Alzheimer's Disease

Renaud Bussiere ^{1,2}, Bénédicte Oulès ³, Arnaud Mary ¹, Loan Vaillant-Beuchot ¹, Cécile Martin ¹, Wejdane El Manaa ¹, Déborah Vallée ^{1,4}, Eric Duplan ¹, Patrizia Paterlini-Bréchet ⁵, Cristine Alves Da Costa ¹, Frédéric Checler ¹ and Mounia Chami ^{1,*}

¹ Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France, Laboratory of excellence DistALZ, 660 route des Lucioles, 06560 Sophia-Antipolis, Valbonne, France; r.bussiere@imperial.ac.uk (R.B.); mary@ipmc.cnrs.fr (A.M.); vaillant@ipmc.cnrs.fr (L.V.-B.); ccilmart1@gmail.com (C.M.); elmanaa@ipmc.cnrs.fr (W.E.M.); deborah-vallee@hotmail.fr (D.V.); duplan@ipmc.cnrs.fr (E.D.); acosta@ipmc.cnrs.fr (C.A.D.S.); checler@ipmc.cnrs.fr (F.C.)

² Present address: UK Dementia Research Institute, Imperial College London, Department of Medicine, Burlington Danes Building, Hammersmith Hospital Campus, Du Cane Road, London W12 0NN, UK

³ Institut Cochin, Team Cutaneous Biology, INSERM U1016, CNRS UMR8104, Université Paris Descartes, 24 rue du Faubourg Saint-Jacques, 75014 Paris, France; benedicte.oules@yahoo.fr

⁴ Université Côte d'Azur, INSERM, U1065, C3M, 06200 Nice, France

⁵ Unité INSERM U1151 (Eq. 13), Faculté de Médecine Paris Descartes, 75993 Paris CEDEX 14, France; patriziapaterlini@gmail.com

* Correspondence: mchami@ipmc.cnrs.fr; Tel.: +33-493-953-457; Fax: +33-493-953-408

Received: 12 November 2019; Accepted: 26 November 2019; Published: 28 November 2019



Abstract: Dysregulation of the Endoplasmic Reticulum (ER) Ca^{2+} homeostasis and subsequent ER stress activation occur in Alzheimer Disease (AD). We studied the contribution of the human truncated isoform of the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1 (S1T) to AD. We examined S1T expression in human AD-affected brains and its functional consequences in cellular and transgenic mice AD models. S1T expression is increased in sporadic AD brains and correlates with amyloid β ($\text{A}\beta$) and ER stress chaperone protein levels. Increased S1T expression was also observed in human neuroblastoma cells expressing Swedish-mutated β -amyloid precursor protein (β APP) or treated with $\text{A}\beta$ oligomers. Lentiviral overexpression of S1T enhances in return the production of APP C-terminal fragments and $\text{A}\beta$ through specific increases of β -secretase expression and activity, and triggers neuroinflammation. We describe a molecular interplay between S1T-dependent ER Ca^{2+} leak, ER stress and β APP-derived fragments that could contribute to AD setting and/or progression.

Keywords: Alzheimer disease; amyloid β ; amyloid precursor protein; BACE1; C83; C99; endoplasmic reticulum stress; neuroinflammation; truncated isoform of the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1 (S1T)

1. Introduction

Alzheimer disease (AD) is a common age-dependent neurodegenerative disease that accounts for most of reported senile dementia cases [1]. The pathological features of AD include the formation of intracellular neurofibrillary tangles (NFTs) composed of hyperphosphorylated Tau, and the extracellular deposition of amyloid- β ($\text{A}\beta$) aggregates derived from the sequential processing of the β amyloid precursor protein (β APP) by β - and γ -secretases [2]. At the cellular level, perturbations of the endoplasmic reticulum (ER) calcium (Ca^{2+}) signalling have emerged as key features

in AD-affected brains and models [3–5]. AD is also one of the prototypical proteinopathies characterized by cortical and hippocampal protein accumulation and aggregation, synaptic impairments, neuronal loss and consistent neuroinflammation [5–7].

Accumulation of unfolded proteins into the ER, as well as alteration of ER Ca^{2+} homeostasis, induce ER stress eliciting unfolded protein response (UPR) [8,9]. Chronic ER stress implicates the mitochondrial apoptotic pathway. Ca^{2+} fluxes from ER to mitochondria, tuned by physical interaction between the two organelles, emerged as a key regulator of this pathway [10–12]. In this context, we reported that the human truncated isoform of the Sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase 1 (S1T) [13] triggers and amplifies ER stress response, leading to subsequent cell commitment to apoptosis through the control of Ca^{2+} mobilization from ER to mitochondria [14].

We report herein the increase of the human S1T protein expression in a cohort of human sporadic AD-derived post-mortem brains as well as in a cellular AD model. S1T elevation is mimicked by oligomeric $\text{A}\beta$ treatment and in return enhances β APP processing and the production of β APP-derived toxic fragments (i.e., C99 and $\text{A}\beta$) in in vitro and in vivo AD models. Mechanistically, we find that S1T-mediated elevation of APP processing occurs through the up-regulation of BACE1 expression and enhanced activity, but not γ -secretase complex expression and activity. Interestingly, we also document that S1T expression induces a neuroinflammatory response in vitro and in vivo.

2. Material and Methods

2.1. Human Brain Samples

All procedures performed in studies involving human participants were in accordance with the ethical standards of the institutional and/or national research committee and with the 1964 Helsinki declaration and its later amendments or comparable ethical studies. Informed consent for tissue donation for research is obtained by the Brain Bank NeuroCEB and has been declared at the Ministry of Higher Education and Research (agreement AC-2013-1887) under their approval procedures.

Brain samples were obtained from the Brain Bank “NeuroCEB” run by a consortium of Patients Associations: ARSEP (association for research on multiple sclerosis), CSC (cerebellar ataxias), and France Parkinson. The consents were signed by the patients themselves or their next of kin in their name, in accordance with the French Bioethical Laws. Cases were anonymized, but information was provided regarding sex, age at death, and neuropathology (Table 1).

Table 1. Demographic data and neuropathological findings related to human brain samples used in SDS-PAGE analyses (temporal lobe), and brain-derived slices used in immunohistochemistry analyses (T1 region of the temporal lobe).

	Age (years)	Gender	PMD (h)	Braak's NFT Stage #
Brain samples used in SDS-PAGE analyses				
Control	84	Male	32	-
Control	71	Female	15	-
Control	55	Male	25	-
Control	78	Male	35	-
Control	61	Male	20	-
Control	74	Female	49	-
ALS	62	Female	44	-
ALS	55	Male	21	-
ALS	62	Female	21	-
AD	81	Female	60	IV
AD	80	Male	23	V
AD	65	Male	70	V
AD	80	Female	51	V
AD	84	Female	81	V

Table 1. Cont.

	Age (years)	Gender	PMD (h)	Braak's NFT Stage #
AD	78	Female	18	VI
AD	65	Female	41	VI
AD	81	Male	19	VI
AD	75	Female	7	VI
AD	89	Female	26	VI
AD	93	Female	21	VI
AD	91	Female	34	VI
AD	55	Female	58	VI
AD	81	Female	NA	VI
AD	79	Male	31	VI
AD	82	Female	NA	VI
AD	86	Male	32	VI
Brain-derived slices used in immunohistochemistry analyses				
Control	62	Female	NA	-
ALS	62	Female	NA	-
ALS	55	Male	NA	-
ALS	68	Female	NA	-
AD	77	Female	NA	III
AD	55	Female	NA	IV
AD	65	Male	NA	V
AD	84	Female	NA	V
AD	82	Male	NA	V
AD	80	Male	NA	V
AD	86	Male	NA	VI
AD	63	Female	NA	VI
AD	79	Male	NA	VI

PMD: Post mortem delay, h: hours, NA: Not available. Controls are brain samples isolated from patients diagnosed as negative for several neuropathologies. ALS are control brains samples diagnosed as negative for AD pathology obtained from post-mortem patients diagnosed with amyotrophic lateral sclerosis (ALS). # Braak and Braak's NFT (neurofibrillary tangle: Tau-related pathology) stage, (-) means no NFT detection.

2.2. Lentiviruses Production

Lentiviruses were obtained by co-transfecting the transfer vector with two helper plasmids, Δ 8.9 (packaging vector) and VSV-G (envelope vector) into Lenti-X 293 T cell line (632180; Clontech, Mountain View, CA, USA). Viral particles were purified from the culture medium, and viral titers were determined by p24 ELISA (VPK-107; Cell Biolabs, San Diego, CA, USA).

2.3. Cell Lines, Lentiviruses Infection, Transfections and Treatments

Human SH-SY5Y neuroblastoma cells (CRL-2266, ATCC), and murine microglial cells (BV2) [15] were cultured following the manufacturer's instructions. SH-SY5Y cells stably expressing empty pcDNA3.1 vector (Control), or the human β APP harboring the double Swedish mutations cDNA (APP^{swe}: APPKM670/671NL) were already described [16].

SH-SY5Y and BV2 cells were transduced with Green, S1T-Green or SERCA1-Green lentiviruses (cloned in the lentiviral vector with an IRES- ZsGreen fluorescent tag (pHAGE-CMV-MCS-IRES-ZsGreen), under the control of CMV promoter) using five MOI (multiplicity of infection) (48h in BV2 cells and 72-96h in SH-SY5Y cells).

We also used pcDNA 3.1, GFP targeted to the ER (ER-GFP), and GFP fused constructs SERCA1-GFP and S1T-GFP previously described [14]. Transient transfection of cells was carried out using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen). Cells were treated overnight for the indicated time with thapsigargin (0.1, 0.5 or 1 μ M), tunicamycin (10 μ g/mL) or amyloid β oligomers (A β) 5 μ M

(as already described [17]). Human synthetic A β _{1–42} (Bachem AG, Switzerland) was prepared as already described [18].

2.4. Animal Models

All applicable international, national, and/or institutional guidelines for the care and use of animals were followed. All procedures performed in studies involving animals were in accordance with the ethical standards of the institution or practice at which the studies were conducted.

In vivo experiments were performed in accordance with the regulations of the Institutional Animal Care and Use Committee of the guidelines established by the European community council (Directive of 24th November 1986), and approved by Nice university Animal care and use Committee, and the National Council on animal care of the Ministry of Health (Project n°: NCE/2013-152).

Also, 3xTg-AD mice [19] were housed in the specific-pathogen-free animal facility with a 12:12 h light/dark cycle and were given free access to food and water.

For biochemical analyses, mice were anesthetized with a ketamine/xylazine (87 mg/mL and 13 mg/mL respectively, 1 mL/kg) mixture and transcardially perfused with PBS for 5 min. Brains were then isolated and stored in the RNA stabilization reagent (RNAlater, Qiagen) for 24 h, and then dried and stored at –80 °C until use. For immunohistochemistry analyses, anesthetized mice were perfused with PBS and then with 10 mL PFA 4% solution. Brains were post-fixed in PFA 4% for 24 h. Fixed brains were cut on a vibratome (50 μ m), or embedded in paraffin, and coronal sections were cut with a sliding microtome (8 μ m).

2.5. Stereotaxic Injections and Treatments

Four-month-old non-transgenic (wild type: WT) and 3xTg-AD mice were anesthetized and then placed in a mouse head holder. Green or S1T-Green lentiviral particles were stereotactically injected bilaterally into the subiculum region (1×10^{10} viral particles, 2 μ L per hemisphere) at the following coordinates (a/p, –1.7, m/l \pm 2.5, d/v, –3.8). After surgery, anesthesia was reversed with atipamezole (1 mg/kg). Mice were left under a heat lamp for allowing full recovery. Then they were injected with the analgesic buprenorphine at a dose of 0.05 mg/kg body weight and returned to a clean cage. Biochemical and immunohistochemistry analyses were carried out 4–5 months after lentiviral injections.

2.6. Protein Preparations and SDS-PAGE Analysis

Total proteins and microsomal and mitochondrial fractions were prepared as already described [14]. Intracellular A β peptide was detected as already described [16]. Proteins were resolved by 16.5% Tris/Tricine or 10–12% Tris/Glycine SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membranes. Antibodies used are described in Supplementary Table S3. Proteins were visualized using enhanced chemiluminescence and acquired with LAS-4000 imaging system (Fujifilm).

2.7. Immunohistochemistry and Immunofluorescence

Human-derived hippocampal and temporal lobe sections and mice-derived slices embedded in paraffin were immunostained after a dewaxing procedure comprising sequential washing steps with xylene, ethanol and PBS. Sections were immunostained with S1T [13] or Iba1 antibodies after antigen unmasking using a Vector Antigen unmasking solution (Vector Laboratories). For 6E10 staining, sections were treated with formic acid (90% for 5 min). Serial slices were immunostained with S1T and 6E10 antibodies. Non-specific binding was blocked for 1 h in 5% BSA, 0.5% TBS-Triton X-100 solution. Sections were incubated at 4 °C overnight with primary antibodies (Supplementary Table S3). Sections were incubated with HRP-conjugated secondary antibodies (Jackson ImmunoResearch) followed by diaminobenzidine (DAB) substrate (Vector). Neuronal nuclei were detected with Cresyl violet.

2.8. In Vitro β -Secretase Assay

BACE-1 activity corresponding to the β -secretase inhibitor-sensitive fluorescence was monitored as already described [16,20].

2.9. Quantitative Real-Time PCR and Amplification S1T

Total RNA from cells and mice brains were extracted using the RNeasy mini kit and RNeasy universal, respectively (Qiagen, Germany) and then reverse-transcribed with GoScript™ Reverse Transcriptase (Promega, USA) using oligo-dT priming. Real-time PCR was performed in the Rotor-Gene6000 (Qiagen, Germany), using the SYBR Green detection protocol. Specific-gene primers are described in the supplementary material (Supplementary Table S4). Hot start touchdown amplification was performed to amplify S1T as already described [13] using primers on SERCA1 exon10 and exon13 sequences as described in Figure 2C and Supplementary Table S4.

2.10. Statistical Analyses

Data were expressed as means \pm SEM. Sample size for each experiment is indicated in the figure captions. Data were analyzed with GraphPad Prism version 7.02 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA; www.graphpad.com). Data were first analyzed for normal distribution. We used the Mann-Whitney test when the two groups of variables have not passed the normality test. Groups of more than two variables that have passed normality test were analyzed by One-way ANOVA with Dunnett's multiple comparison post-test. Correlations were analyzed with Spearman's correlation coefficient. Significant differences are: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ and ns = non-significant.

3. Results

3.1. S1T Protein Expression is Increased in Human AD Brains

We first analyzed the expression of S1T in a cohort of sporadic human AD brains and aged-matched non-demented controls (see Table 1 for demographic data and neuropathological status). As expected, we revealed significantly increased levels of A β peptide (Figure 1A,B) and of hyperphosphorylated Tau protein (P-Tau, Figure 1A,C) in AD brains while full-length β APP (Figure 1A,E) remained unchanged. Neurofilament (NF) was also unchanged (Figure 1A,F). Importantly, by using an antibody specifically recognizing S1T protein but not full-length SERCA1 protein [13], we observed a significant increase of the expression of S1T in AD-affected brains (Figure 1A,D). We confirmed this increase with an anti-SERCA1 antibody recognizing the N-terminal sequence of both S1T and full-length SERCA1. We also revealed that full-length SERCA1 isoform appeared poorly expressed in both control and AD brains (Figure 1A). Additionally, we revealed that S1T expression levels correlated with both A β (Figure 1G) and P-Tau (Figure 1H) levels. These biochemical observations were strengthened by immunohistochemical analysis that revealed an increased staining of S1T in AD brain slices as compared to controls (Figure 1I, Table 1, and Supplementary Table S1). We classified S1T staining intensity as high or low (as shown in representative images in Figure 1I). These analyses showed that high-intensity staining of S1T was associated with focal A β deposits while low S1T staining was observed in samples displaying diffuse plaques (Supplementary Table S1), thus corroborating our biochemical observations linking high S1T expression to elevated levels of A β . We also observed an increased expression of S1T in the hippocampus of AD-derived brains as compared to controls (Supplementary Figure S1, and Supplementary Table S2). Overall, this set of data suggests a consistent increase of S1T isoform expression in various brain areas of a large cohort of late-stage sporadic AD-affected human brains.

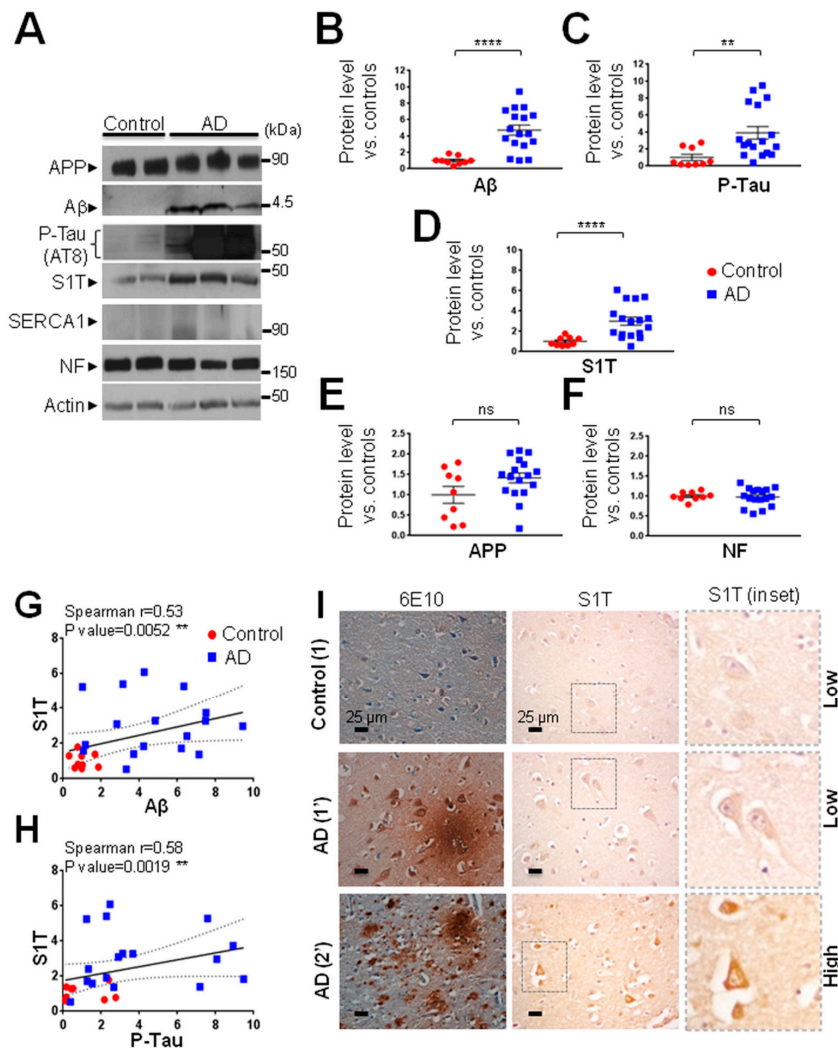


Figure 1. S1T expression is increased in human AD-affected brains. **(A)** Representative SDS-PAGE showing the expression pattern of S1T, APP, A β , Hyperphosphorylated Tau (P-Tau), Neurofilament (NF) in the temporal lobe of human AD brains (Braak's stage IV, V and VI) (n = 17) as compared to aged-matched non-demented controls (n = 9). Demographic data and neuropathological status of brain samples are reported in Table 1. β APP and A β were detected using 6E10 antibody (recognizing amino acids 1–16 of A β). Hyperphosphorylated Tau was detected by using AT8 antibody (recognizing phosphorylated (serine 202 and threonine 205) protein helical filament Tau, but not unphosphorylated Tau). Neurofilament (NF) and Actin were used as loading controls. S1T was detected using a homemade antibody recognizing a specific epitope in S1T protein directed towards the COOH-terminal 10 amino acid generated by exon 11 splicing [13]. SERCA1 was detected using an antibody recognizing N-terminal epitope. **(B–F)** Graphs represent means \pm SEM of protein expression levels analyzed versus mean control values considered as 1. **** *p*-value < 0.0001, ** *p*-value < 0.01, and (ns) non-significant versus control using the Mann-Whitney test. **(G,H)** Correlation analyses between S1T expression and A β or P-Tau. Statistical Spearman *r* values and *p*-values were obtained using both control and AD individuals' data. The regression line (dotted lines representing the 95 % confidence interval) is based on merged data. **(I)** Immunohistochemical detections of β APP-derived fragments and of A β plaques with 6E10 antibody or of S1T in the temporal lobe of human AD (n = 9) and of aged-matched non-demented control brains (n = 4). Demographic data and neuropathological status of brain samples are reported in Table 1. S1T staining intensity and A β plaque type are reported in Supplementary Table S1. Nuclei were revealed using Cresyl Violet dye in 6E10 stained slices. The insets show S1T positive neurons. Scale bar 25 μ m. Control (1), and AD (1' and 2') are referenced in Supplementary Table S1 and are representative samples harboring low or high S1T immunostaining.

3.2. ER Stress-Associated PERK-eIF2 α -ATF4 Pathway Is Modulated in Human AD Brains

We previously reported that S1T is induced under pharmacological and physiopathological ER stress conditions through the PERK-eIF2 α -ATF4 pathway [14]. We thus analyzed the expression of ER stress markers belonging to this pathway in our sporadic human AD-derived brains cohort. We observed a significant increase of the expressions of ATF4 (Figure 2A,E), GRP78 (Figure 2A,F), and calreticulin (CRT) (Figure 2A,H) in AD brains as compared to controls, while the ubiquitous SERCA2b isoform (Figure 2A,B), p-eIF2 α (Figure 2A,C), and GRP94 (Figure 2A,G) expressions remained unchanged. A slight but a significant decrease of CHOP protein was also observed in AD-derived brain samples (Figure 2A,D). We further revealed that increases of CRT and to a lesser extent GRP78, positively correlate with A β or S1T levels (Figure 2I–L) while correlation analyses between CHOP, ATF4, GRP94, and p-eIF2 α proteins and A β or S1T levels failed to reach statistical significance (data not shown). All over, these data revealed for the first time an increased level of S1T protein in sporadic AD brains correlating with ER chaperones GRP78 and CRT (Figures 1 and 2).

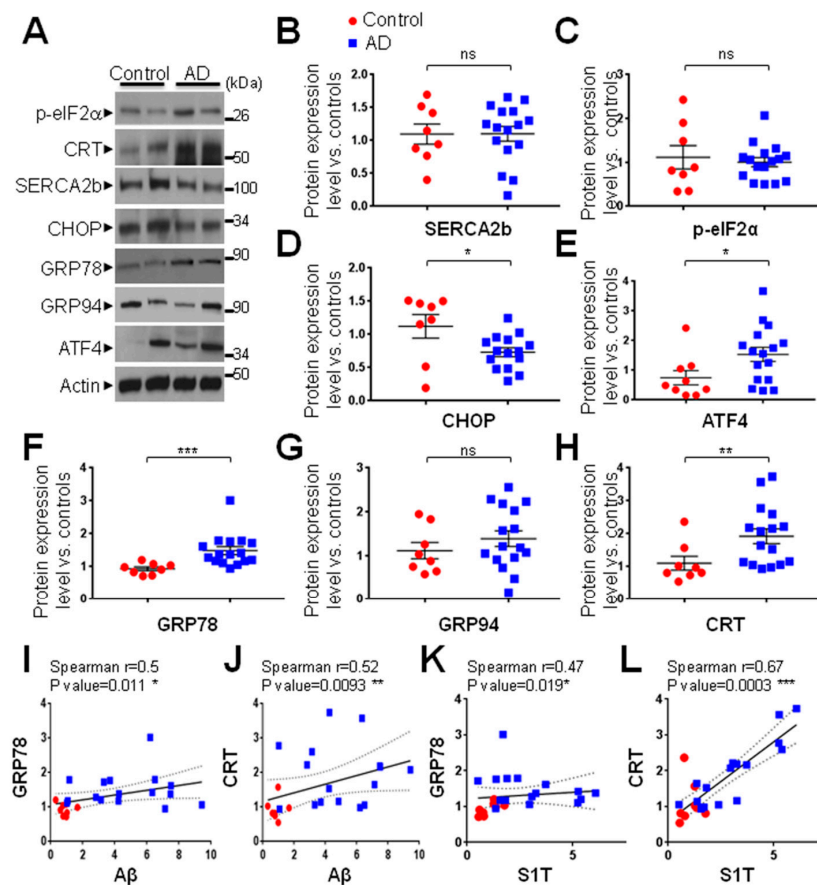


Figure 2. Expression of ER stress markers in human AD-affected brains. Demographic data and neuropathological findings of brain samples are reported in Table 1. (A) Representative SDS-PAGE showing the expression pattern of p-eIF2 α , Calreticulin (CRT), SERCA2b, CHOP, glucose-regulated protein 78 (GRP78) and 94 (GRP94), and ATF4 in the temporal lobe of human AD-affected brains ($n = 15$ – 16) as compared to age-matched non-demented controls ($n = 8$ – 9). Actin was used as a loading control. (B–H) Graphs represent means \pm SEM protein expression levels analyzed versus mean control values considered as 1. *** p -value < 0.001 , ** p -value < 0.01 , * p -value < 0.05 , and (ns) non-significant versus control using the Mann-Whitney test. (I–L) Correlation analyses of GRP78 (I,K), and CRT (J,L) expression levels with A β (I,J) or S1T (K,L). Statistical Spearman r values and p -values were obtained using both control and AD individual's data. The regression line (dotted lines representing the 95% confidence interval) are based on merged data.

3.3. S1T Protein Expression is Increased in Human SH-SY5Y Cells Expressing APP^{swe} or Treated by Oligomeric A β

We then investigated expressions of S1T and ER stress markers in the neuroblastoma SH-SY5Y cell line stably expressing the Swedish mutated APP (APP^{swe}: SH-SY5Y APP^{swe}). This mutation was previously shown to enhance β -secretase-mediated cleavage of β APP, thereby increasing productions of the β APP C-terminal fragment C99, and subsequently A β peptides [16]. We confirmed the overexpression of full-length β APP and enhanced production of A β in APP^{swe} expressing cells as compared to mock-transfected control cells (Figure 3A,B). Importantly, we observed increased expressions of S1T protein (Figure 3A,C), CRT, GRP78, GRP94 (Figure 3A,D), and p-eIF2 α (Figure 3A,E) in APP^{swe}-expressing cells, while (as observed in human brains), the ubiquitous SERCA2b isoform expression remained unchanged (Figure 3A,C). Unlike what was observed in AD brains, we did not observe any significant modification of the expression of CHOP and ATF4 (data not shown).

Several lines of evidence indicate that oligomeric A β could act as a neurotoxic trigger in AD pathology through the induction of ER stress [21]. In accordance with previous studies, we used soluble synthetic A β 42 oligomers (oA β) as a toxic trigger [22,23], and specific set of primers allowing the amplification of both SERCA, and S1T transcripts (Figure 3F). S1T mRNA was increased in oA β -treated SH-SY5Y cells as compared to non-treated (NT) cells (Figure 3G), as illustrated by an increased S1T/SERCA1 mRNA ratio (Figure 3I). We also observed an increase of CHOP transcript level and a slight but significant decrease of GRP78 mRNA upon oA β treatment (Figure 3J). This agrees with previous studies showing that oA β exposure modulates the expression of GRP78 and CHOP at the mRNA and protein levels in a time-dependent manner in SH-SY5Y cells [24]. As controls, we revealed that pharmacological ER stress induction by thapsigargin (TG) (a specific inhibitor of SERCA proteins) increased S1T/SERCA1 mRNA ratio (Figure 3H,I) as well as GRP78 and CHOP mRNAs levels (Figure 3J). Together, our data unraveled a consistent induction of S1T in neuroblastoma cells endogenously producing β APP-derived fragments (APP^{swe} cells) or exogenously treated with A β oligomers.

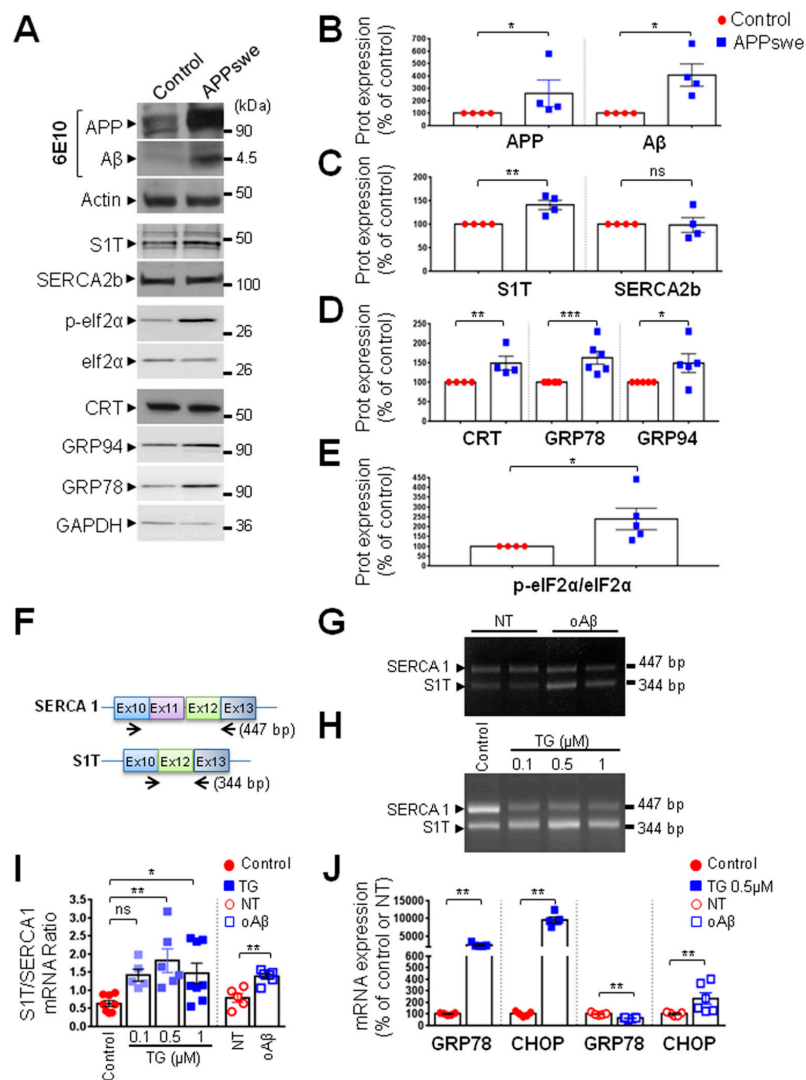


Figure 3. S1T expression is increased in the SH-SY5Y cells expressing APP_{swe} and in SH-SY5Y cells treated with oligomeric A β peptides. (A) Representative SDS-PAGE showing the expression pattern of β APP, A β as detected using 6E10 antibody, and of S1T and ER stress markers (SERCA2b, p-eIF2 α , eIF2 α , CRT, GRP78 and GRP94) in SH-SY5Y cells expressing pcDNA3.1 empty vector (Control) or APP_{swe} construct (APP_{swe}). Actin or GAPDH were used as loading controls. (B–E) Graphs represent means \pm SEM of protein expression levels analyzed versus mean control values considered as 100% and obtained in 4–6 independent experiments. *** *p*-value < 0.001, ** *p*-value < 0.01, * *p*-value < 0.05, and (ns) non-significant versus control using the Mann-Whitney test. (F) Position of the primers (on exons 10 and 13) used to amplify SERCA1 transcripts with (447 bp: SERCA1) or without (344 bp: S1T) exon 11. (G,H) Representative gels of RT-PCR of SERCA1 and S1T expression patterns in SH-SY5Y cells non-treated (NT) or treated with oligomeric A β peptides (oA β) (5 μ M) (G), or treated with vehicle (Control) or thapsigargin (TG) (0.1, 0.5, and 1 μ M) for 20 h (H). (I) Graph represents means \pm SEM of S1T/SERCA1 mRNA ratio obtained in at least 4 independent experiments. ** *p*-value < 0.01, * *p*-value < 0.05, and (ns) non-significant versus control using the one-way ANOVA and Dunnett’s post-test, or versus NT using the Mann-Whitney test. (J) Quantitative RT-PCR of GRP78 and CHOP in SH-SY5Y cells treated with A β oligomers as in (G) or with 0.5 μ M of TG (H). Genes were normalized for RNA concentrations with topoisomerase1 and GAPDH. The graph represents means \pm SEM mRNA levels analyzed versus mean control or NT values taken as 100%. ** *p*-value < 0.01, versus control or NT using the Mann-Whitney test.

3.4. Expression of S1T Protein Enhances Amyloidogenic Processing of β APP through Increased BACE1 Expression and Activity

We generated lentivirus-based stable SH-SY5Y APP_{swe} cell lines expressing S1T or SERCA1 cDNA simultaneously with the ZsGreen protein under IRES cassette. These constructs allow easy in situ detection after cell transduction (Figure 4A). S1T and SERCA1 overexpressions were also biochemically validated in microsomal protein extracts prepared from SH-SY5Y APP_{swe} cells (Figure 4B).

We examined the potential modulation of β APP processing by S1T by analyzing the level of intracellular β APP-derived fragments. As shown in the representative SDS-PAGE (Figure 4B,C) and quantitative analyses (Figure 4D), S1T but not SERCA1 overexpression increased the production of all intracellular β APP-derived fragments (C83, C99, A β , and AICD). Importantly, this was not due to increased full-length β APP level (Figure 4C,D).

Further, we showed that S1T overexpression led to the accumulation of β APP-derived fragments in the mitochondrial fraction (Supplementary Figure S2A,B).

We then investigated the potential implication of S1T in the modulation of non-amyloidogenic metabolism of β APP. Neither S1T nor SERCA1 altered the production of the soluble sAPP α derived from the cleavage of β APP by α -secretase (Supplementary Figure S3A,B). Accordingly, the expression of constitutive α -secretase (ADAM10) was not affected by S1T and SERCA1 (Supplementary Figure S3C,D).

Amyloidogenic metabolism of β APP implies its sequential cleavage by β - and γ -secretases [25]. Thus the increase of C99 and A β peptide production upon S1T overexpression may be linked to the increased expression and/or activity of β - and/or γ -secretases. We showed that SH-SY5Y APP_{swe} stably expressing S1T but not SERCA1 displayed increased expression of BACE1 (Figure 4E,F). Accordingly, we then revealed that S1T but not SERCA1 triggered a significant increase of the β -secretase specific activity in APP_{swe} expressing cells (Figure 4G). The analyses of the expression of components of the γ -secretase complex [26] (Pen 2, Aph1, Nicastrin, PS1, and PS2) (Supplementary Figure S4A–F) revealed an unchanged level of PS1 (the catalytic core of the γ -secretase complex) in S1T expressing cells (Supplementary Figure S4A–F). Accordingly, we did not observe any significant modulation of the γ -secretase activity as analyzed in reconstituted membranes prepared from APP_{swe} cells expressing S1T or SERCA1 proteins (Supplementary Figure S4G). Overall, these data reveal that enhanced β -amyloidogenic processing of β APP upon S1T expression is specifically linked to the modulation of BACE1 expression and activity. Thus, the enhanced α -secretase-derived C83 fragment is likely due to an enhanced level of its precursor C99 fragment [27].

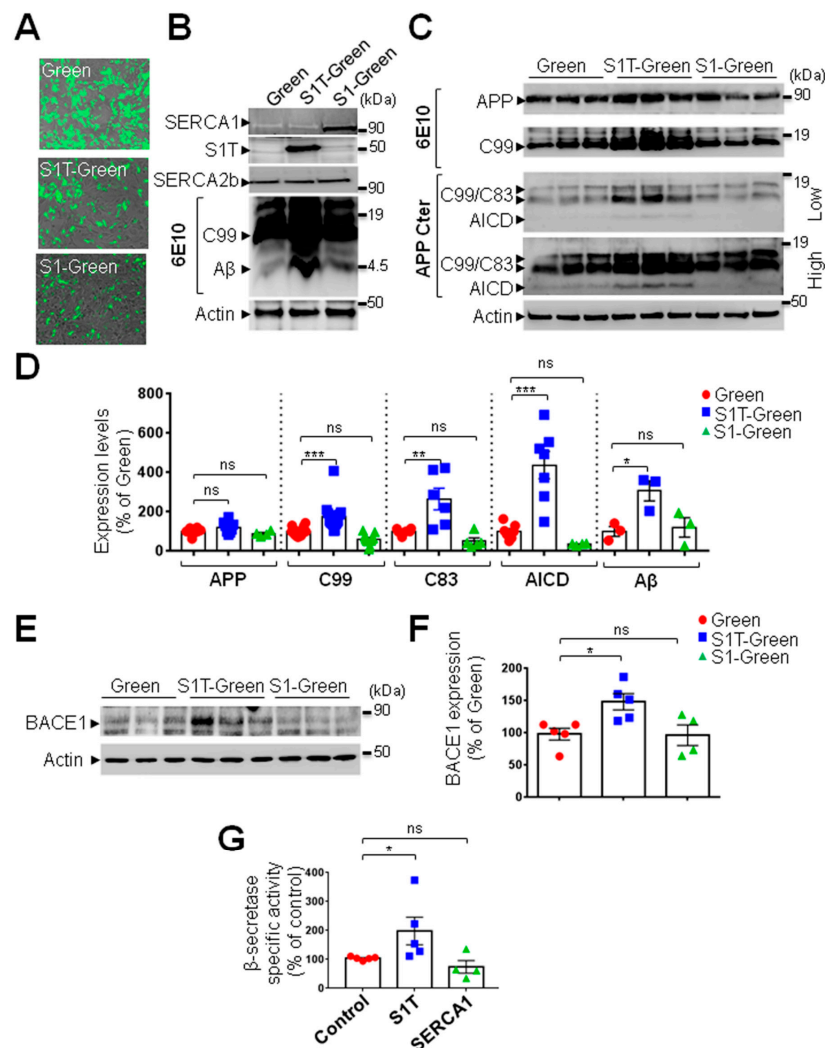


Figure 4. S1T overexpression enhances amyloidogenic β APP processing. (A) Representative images of SH-SY5Y APPsw lentivirus-mediated stable Green, S1T-Green and SERCA1-Green cell lines. (B) Representative SDS-PAGE showing the expression patterns of SERCA1, S1T (detected with SERCA1 N-terminal antibody) and of β -secretase C-terminal APP-derived fragment (C99) and A β (detected with 6E10 antibody) in SH-SY5Y APPsw transduced cells. SERCA2b and actin were used as loading controls. (C) Low and high exposures of representative SDS-PAGE showing the expression pattern of full-length β APP and C99 (detected with 6E10 antibody), and C99 and C83 (α -secretase-derived APP C-terminal fragment) and APP intracellular domain (AICD) as detected using an antibody recognizing APP C-terminal epitope (APP-Cter). Actin was used as a loading control. (D) The graph represents means \pm SEM of protein expression levels analyzed versus mean control values (Green) considered as 100% and obtained in at least 4 independent experiments. *** p -value < 0.001, ** p -value < 0.01, * p -value < 0.05, and (ns) non-significant versus control using the one-way ANOVA and Dunnett’s post-test. (E) Representative SDS-PAGE showing BACE1 expression in SH-SY5Y APPsw cells transduced with Green, S1T-Green and SERCA1-Green lentiviruses. Actin was used as a loading control. (F) The graph represents means \pm SEM of BACE1 expression level versus mean control values (Green) considered as 100% and obtained in at least 4 independent experiments. * p -value < 0.05, and (ns) non-significant versus Green using the one-way ANOVA and Dunnett’s post-test. (G) The graph represents the means \pm SEM of the specific activity of β -secretase in SH-SY5Y APPsw cells transfected with ER-GFP (Control), S1T-GFP (S1T), SERCA1-GFP (SERCA1). β -secretase specific activity is shown as % of mean control values considered as 100%. * p -value < 0.05, and (ns) non-significant versus control using the one-way ANOVA and Dunnett’s post-test.

3.5. Lentiviral Expression of S1T Enhances β -Secretase-Mediated APP Processing In Vivo

The level of basal expression of S1T was not significantly enhanced in 3xTg-AD mice at different ages as compared to age-matched wild type mice (Supplementary Figure S5A,B). This observation was further confirmed in a second AD mice model, the Tg2576 mice (Supplementary Figure S5C). These data reveal a specific induction of S1T in human-derived cells and brains. Thus, we sought to investigate the impact of S1T overexpression in vivo through bilateral stereotaxic injection of lentiviral particles expressing S1T-Green or Green proteins in the subiculum of 3xTg-AD mice and their controls (Figure 5A,B). We confirmed the expected expression of Green protein (Figure 5C,D) and that of S1T in the subiculum of injected mice (Figure 5D,E). Interestingly, we observed that S1T overexpression enhanced the production of the C99 fragment in 3xTg-AD mice (Figure 5D,F).

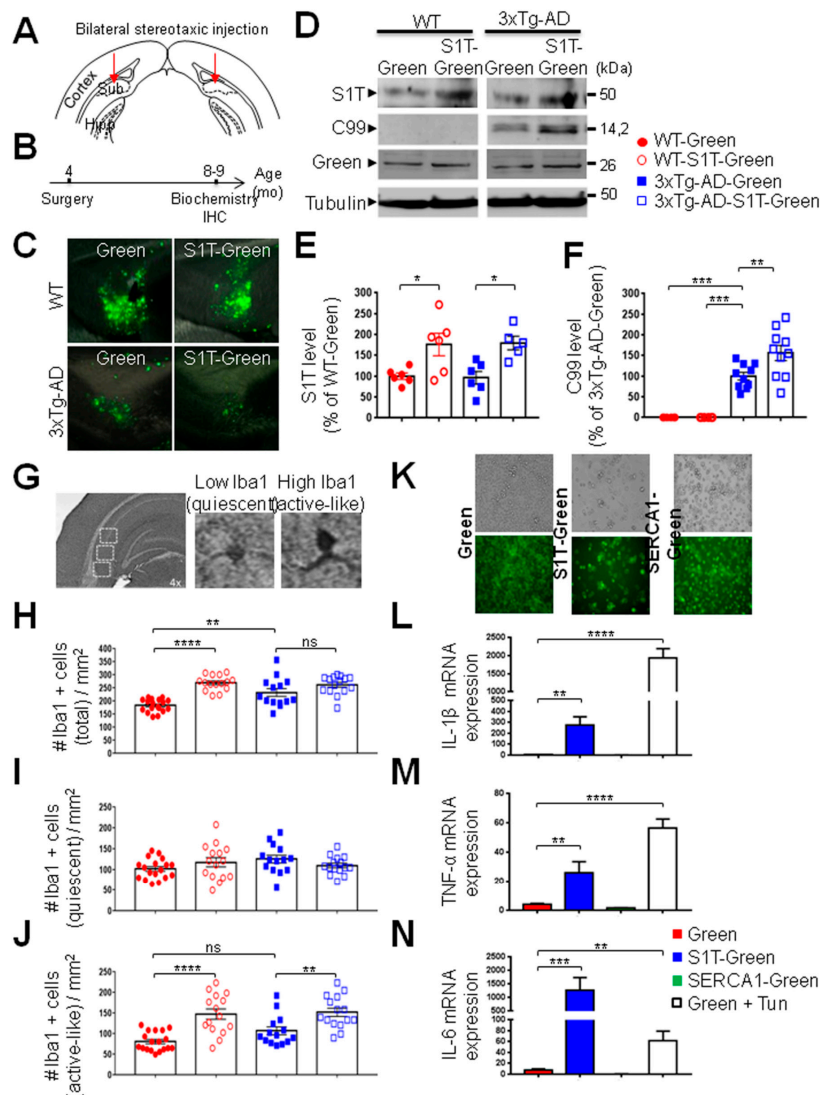


Figure 5. Lentivirus-mediated S1T delivery increases C99 production and triggers neuroinflammation in the 3xTg-AD mice. (A) Bilateral stereotaxic injection of lentiviruses (Green or S1T-Green) into the hippocampus (subiculum region) of 3xTg-AD and non-transgenic control mice (wild type: WT). (B) Timeline of lentiviral injection (mice aged 4 months-old) and of subsequent biochemical analysis and immunohistochemistry of mice (mice aged 8–9 months-old). (C) Representative coronal brain slices showing Green-positive cells (green) in injected mice. (D) Representative SDS-PAGE showing S1T, C99, and Green protein expression in injected mice. Tubulin was used as a loading control. (E) The graph represents the means \pm SEM of S1T expression expressed as the percent of control WT mice considered

as 100% (WT-Green (n = 6); WT-S1T-Green (n = 6), 3xTg-AD-Green (n = 6), and 3xTg-AD-S1T-Green (n = 5). * *p*-value < 0.05 versus WT-Green or 3xTg-AD-Green using the one-way ANOVA and Tukey's post-test. (F) The graph represents the means \pm SEM of C99 level versus the mean value in 3xTg-AD mice injected with Green lentivirus considered as 100%. *** *p*-value < 0.001, and ** *p*-value < 0.01 versus 3xTg-AD-Green using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test. (G) The number of total, quiescent, and activated microglia was recorded in three fields in the subiculum of injected mice. Quiescent microglia (low Iba1 staining and ramified microglia) and activated-like microglia (high Iba1 staining with thickened processes) were identified in separate fields in 3 different mice in each group. (H–J) Quantification of the total number (H), quiescent (I), and active-like Iba1 positive cells/mm² (J). **** *p*-value < 0.0001, and ** *p*-value < 0.01, and (ns) non-significant versus WT-Green or 3xTg-AD-Green using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test. (K–N) Expression of S1T enhances the expression of proinflammatory cytokines in BV2 microglial cells. (K) Representative images showing BV2 cells infected with Green, S1T-Green or SERCA1-Green lentiviruses. (L–N) RT-PCR analysis of mRNA expression of IL1- β (G), TNF- α (M), and IL-6 (N). BV2 cells treated with tunicamycin (Tun) at 10 μ g/mL, 16 h were used as control. The relative expression levels of mRNAs are represented as the means \pm SEM versus the mean value in Green expressing cells (control) considered as 1 and obtained in 4 independent experiments in duplicates. **** *p*-value < 0.0001, *** *p*-value < 0.001, and ** *p*-value < 0.01 versus Green using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test.

3.6. Lentiviral Expression of S1T Protein Activates Microglia In Vivo and Enhances Proinflammatory Gene Expression in Cells

In addition to coordinating the expression of stress response genes during ER stress, the UPR initiates inflammatory pathways essential for the innate immune response [5,28]. Thus, we investigated the potential implication of S1T expression in neuroinflammation and focused on microglia activation. We analyzed proliferative activity and morphological changes (the main characteristic properties of active microglia) in both control and 3xTg-AD injected mice (as described in Figure 5A). In three areas of the subiculum (Figure 5G), we quantified the number of total microglia, quiescent ramified microglia characterized by low Iba1 intensity staining, and active-like microglia characterized by high Iba1 intensity staining with thickened processes and irregular cell bodies (see representative images in Figure 5G).

We observed an increased proliferative activity of microglia in 3xTg-AD mice as compared to control mice injected with Green lentivirus, as well as a significant increase of the number of total microglia in wild type mice upon S1T expression (Figure 5H). We also unraveled an increased active-like microglia in both wild type and 3xTg-AD mice injected with S1T lentivirus (Figure 5J), while the number of quiescent microglia between the different groups remained unchanged (Figure 5I). As a control, we performed the same analyses in a pharmacological model of ER stress obtained by intraperitoneal injection of tunicamycin in young wild type mice (Supplementary Figure S6). Tunicamycin treatment increases p-eIF2 α , CHOP and calreticulin levels (Supplementary Figure S6A,B). Interestingly, as was seen upon S1T expression, we observed an enhanced number of total and activated microglia in tunicamycin-treated mice (Supplementary Figure S6C–E), while the number of quiescent microglia remained unchanged (Supplementary Figure S6F).

We further demonstrate the potential implication of S1T and of ER stress in neuroinflammatory response and revealed a significant increased expression of interleukin 1 β (IL1- β) (Figure 5L), tumor necrosis α (TNF- α) (Figure 5M), and interleukin 6 (IL-6) (Figure 5N) in BV2 cells upon S1T-Green expression (Figure 5K), or treatment with tunicamycin, but not upon SERCA1-Green expression (Figure 5K–N). Importantly, we also reported enhanced IL1- β , TNF- α , and IL-6 mRNA levels in vivo in tunicamycin-treated mice (Supplementary Figure S5G). Altogether, both in vivo and in vitro approaches demonstrate a regulation of neuroinflammatory response under ER stress conditions triggered by S1T expression or pharmacological challenge.

4. Discussion

Several studies have reported that UPR occurs relatively early in AD and that ER stress sensors PERK and IRE1 α are activated in human AD brains [29,30]. We previously demonstrated that the human S1T isoform is induced under pharmacological and physiopathological ER stress conditions leading to ER stress amplification [14]. UPR activation has been proposed to be linked to intracellular A β accumulation [31]. Accordingly, we reveal herein that S1T is upregulated in a cellular AD model overproducing β APP-derived catabolites. Importantly, biochemical data indicate that enhanced human S1T expression correlates with A β load in human AD-affected brains and that S1T high immunostaining is selectively observed in human AD cases harboring focal A β plaques. We further demonstrated that S1T expression is induced by exogenous application of A β oligomers in SH-SY5Y cells.

S1T is induced through the activation of the PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway [14]. We observed an increased expression of p-eIF2 α in SH-SY5Y APP^{swe} cells thus confirming previous studies reporting increased phosphorylation of eIF2 α in both in cellular and in vivo models expressing the APP^{swe} mutation [32]. However, we observed discrepancies for p-eIF2 α , ATF4 and CHOP expressions between SH-SY5Y APP^{swe} cells and AD brains. These data may indicate distinct time-dependent regulations of PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway in cells and in vivo AD study models. Accordingly, we and others reported that UPR genes show a dose- and time-dependent induction, transient decline, and re-induction kinetics under pharmacological ER stress stimuli [14,33]. Moreover, elevations of p-PERK, p-IRE1, and p-eIF2 α in human AD were demonstrated to be brain-area dependent [34], associated with abnormally phosphorylated Tau [30,34,35], and likely more involved at the early stages of AD pathology [7,30]. Thus, cellular and mice AD models could not fully recapitulate the pathological alterations observed in human AD progression. According to this possibility, the induction of ER stress response in AD mice models has been recently questioned [36–38], and we did not reveal any change in the expression of endogenous S1T, nor of the GRP78 level in the 3xTg-AD mice at different ages (Supplementary Figure S5A,B).

We reveal that S1T overexpression increases the accumulation of intracellular β APP-derived fragments (C-terminal fragments: CTFs (C99, and C83), A β , and AICD) in the mitochondrial fraction of APP^{swe} cells. We previously documented an A β and β APP-CTFs accumulation in mitochondria-associated membranes (MAMs) in both in vitro and in vivo AD models [22]. Other studies showed that these fragments harbor toxic properties toward mitochondria [21,39]. Thus, we propose that S1T-mediated intracellular/mitochondrial accumulations of β APP-derived toxic fragments may promote mitochondrial-dependent cell death.

S1T-associated pro-amyloidogenic phenotype is mechanistically linked to increased BACE1 expression and activity with no alterations of α - and γ -secretases. Several lines of evidence indicated that enhanced phosphorylations of PERK and eIF2 α in the AD brain are associated with increased amyloidogenic β APP processing [32,40,41] through increased BACE1 expression [42,43]. Altogether, and as reviewed in [44], our data strengthen the molecular link between ER stress and BACE1.

The three UPR branches converge on activating NF- κ B, thus driving the expression of cytokines (TNF α , IL-1, IL-6 and IL-8) [28], accordingly, we demonstrate herein that S1T overexpression, as well as tunicamycin treatment, induce the expression of proinflammatory cytokines and increase proliferation and active microglia. Tunicamycin induces ER stress response and enhances S1T expression thus exacerbating ER stress response and ER Ca²⁺ leak [14]. Tunicamycin also activates gangliosides biosynthesis [45], thereby interfering with APP processing [46]. A recent study also reported that in vivo tunicamycin administration induced spatial memory deficits and impairments of synaptic plasticity in rats [47]. These data are in agreement with our observations linking S1T in particular and ER stress response in general to AD development and/or progression. Overall, our study provides evidence that S1T expression may impact disease development through the upregulation of β -secretase-mediated β APP processing and neuroinflammatory response using both cellular and in vivo study models. Thus, we propose an amplifying mechanism in a positive feedback loop

between S1T and amyloidogenic β APP processing likely accounting for the enhanced ER stress and neuroinflammation occurring in AD (Figure 6).

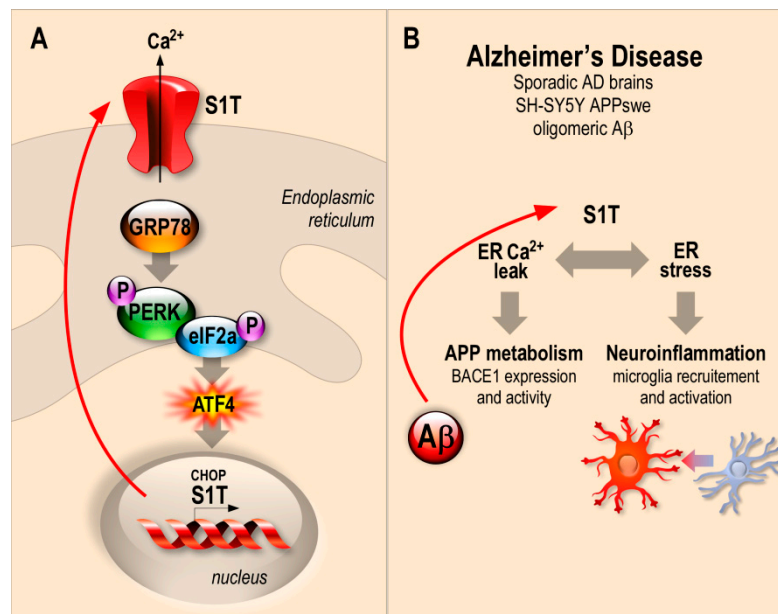


Figure 6. Schematic representation of the molecular interplay between S1T-dependent ER Ca²⁺ leak, ER stress, β APP processing, and neuroinflammation likely contributing to AD setting and/or progression. (A) The human truncated isoform of the sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1 (S1T) expression is induced under ER stress conditions through the PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP pathway, and triggers and amplifies ER stress response through the control of Ca²⁺ mobilization from ER. (B) S1T is upregulated in sporadic AD brains and in cellular models overproducing β APP fragments (SH-SY5Y APPsw). S1T expression is also induced by exogenous oligomeric A β and enhances in turn β APP processing through enhanced BACE1 expression and activity and triggers microglia recruitment and activation in vitro and in vivo.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/8/12/1539/s1>.

Author Contributions: M.C. conceived and designed the study, conducted studies, analyzed data, wrote and edited the manuscript. B.O. and M.C. conducted studies and analyzed data of human AD cohort. R.B. conducted studies and analyzed data in cellular models, the 3xTg-AD and tunicamycin treated mice. C.M. conducted studies and analyzed data in cellular models. D.V. conducted BACE1 expression and activity, W.E.M., E.D., and C.A.D.C. conceived tunicamycin mice model, and obtained brain protein and mRNA samples. A.M. and L.V.-B. analyzed ER stress and neuroinflammation in tunicamycin treated mice. F.C. analyzed and discussed data and edited the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Funding: This work was supported by Fondation Vaincre Alzheimer (#13737) (MC), «Fondation pour la Recherche Médicale» (DEQ20071210550) (PPB, and MC), LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease) (FC), the University Hospital Federation (FHU) OncoAge (FC).

Acknowledgments: We acknowledge the Viral Vector and Gene Transfer Platform, Université Paris Descartes-Sorbonne Paris Cité, Institut Fédératif de Recherche Necker Enfants Malades, 75014 Paris, France for the first lentiviruses productions and "Brainbank Neuro-CEB Neuropathology Network" as the source of the Biological Material (human brains) and Associated Data. *The NeuroCEB Neuropathology network includes: Franck Letournel (CHU Angers), Marie-Laure Martin-Négrier (CHU Bordeaux), Françoise Chapon (CHU Caen), Catherine Godfraind (CHU Clermont-Ferrand), Claude-Alain Maurage (CHU Lille), Vincent Deramecourt (CHU Lille), David Meyronnet (CHU Lyon), Nathalie Streichenberger (CHU Lyon), André Maues de Paula (CHU Marseille), Valérie Rigau (CHU Montpellier), Fanny Vandenbos-Burel (Nice), Charles Duyckaerts (CHU PS Paris), Danielle Seilhean (CHU PS, Paris), Susana Boluda (CHU PS, Paris), Isabelle Plu (CHU PS, Paris), Serge Milin (CHU Poitiers), Dan Christian Chiforeanu (CHU Rennes), Annie Laquerrière (CHU Rouen), Béatrice Lannes (CHU Strasbourg).

Conflicts of Interest: The authors declare that they have no conflicts of interest.

References

1. Scheltens, P.; Blennow, K.; Breteler, M.M.; De Strooper, B.; Frisoni, G.B.; Salloway, S. Van der Flier WM: Alzheimer's disease. *Lancet* **2016**, *388*, 505–517. [[CrossRef](#)]
2. Zhang, Y.W.; Thompson, R.; Zhang, H.; Xu, H. APP processing in Alzheimer's disease. *Mol. Brain* **2011**, *4*, 3. [[CrossRef](#)]
3. Del Prete, D.; Checler, F.; Chami, M. Ryanodine receptors: Physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Mol. Neurodegener.* **2014**, *9*, 21. [[CrossRef](#)]
4. Cadonic, C.; Sabbir, M.G.; Albeni, B.C. Mechanisms of Mitochondrial Dysfunction in Alzheimer's Disease. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 6078–6090. [[CrossRef](#)]
5. Huang, H.C.; Tang, D.; Lu, S.Y.; Jiang, Z.F. Endoplasmic reticulum stress as a novel neuronal mediator in Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* **2015**, *37*, 366–374. [[CrossRef](#)]
6. Briggs, D.I.; Defensor, E.; Memar Ardestani, P.; Yi, B.; Halpain, M.; Seabrook, G.; Shamloo, M. Role of Endoplasmic Reticulum Stress in Learning and Memory Impairment and Alzheimer's Disease-Like Neuropathology in the PS19 and APP(Swe) Mouse Models of Tauopathy and Amyloidosis. *Eneuro* **2017**. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Scheper, W.; Hoozemans, J.J. The unfolded protein response in neurodegenerative diseases: A neuropathological perspective. *Acta Neuropathol.* **2015**, *130*, 315–331. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Zhao, L.; Ackerman, S.L. Endoplasmic reticulum stress in health and disease. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2006**, *18*, 444–452. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Hetz, C.; Papa, F.R. The Unfolded Protein Response and Cell Fate Control. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 169–181. [[CrossRef](#)]
10. Hajnoczky, G.; Csordas, G.; Madesh, M.; Pacher, P. The machinery of local Ca²⁺ signalling between sarco-endoplasmic reticulum and mitochondria. *J. Physiol.* **2000**, *529*, 69–81. [[CrossRef](#)]
11. Rizzuto, R.; Pinton, P.; Carrington, W.; Fay, F.S.; Fogarty, K.E.; Lifshitz, L.M.; Tuft, R.A.; Pozzan, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* **1998**, *280*, 1763–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Brough, D.; Schell, M.J.; Irvine, R.F. Agonist-induced regulation of mitochondrial and endoplasmic reticulum motility. *Biochem. J.* **2005**, *392*, 291–297. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Chami, M.; Gozuacik, D.; Lagorce, D.; Brini, M.; Falson, P.; Peaucellier, G.; Pinton, P.; Lecoeur, H.; Gougeon, M.L.; le Maire, M.; et al. SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis. *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 1301–1314. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Chami, M.; Oules, B.; Szabadkai, G.; Tacine, R.; Rizzuto, R.; Paterlini-Brechot, P. Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 641–651. [[CrossRef](#)]
15. Blasi, E.; Barluzzi, R.; Bocchini, V.; Mazzolla, R.; Bistoni, F. Immortalization of murine microglial cells by a v-raf/v-myc carrying retrovirus. *J. Neuroimmunol.* **1990**, *27*, 229–237. [[CrossRef](#)]
16. Oules, B.; Del Prete, D.; Greco, B.; Zhang, X.; Lauritzen, I.; Sevalle, J.; Moreno, S.; Paterlini-Brechot, P.; Trebak, M.; Checler, F.; et al. Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 11820–11834. [[CrossRef](#)]
17. Bussiere, R.; Lacampagne, A.; Reiken, S.; Liu, X.; Scheuerman, V.; Zalk, R.; Martin, C.; Checler, F.; Marks, A.R.; Chami, M. Amyloid beta production is regulated by beta2-adrenergic signaling-mediated post-translational modifications of the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 10153–10168. [[CrossRef](#)]
18. De Felice, F.G.; Wu, D.; Lambert, M.P.; Fernandez, S.J.; Velasco, P.T.; Lacor, P.N.; Bigio, E.H.; Jerecic, J.; Acton, P.J.; Shughrue, P.J.; et al. Alzheimer's disease-type neuronal tau hyperphosphorylation induced by A beta oligomers. *Neurobiol. Aging* **2008**, *29*, 1334–1347. [[CrossRef](#)]
19. Oddo, S.; Caccamo, A.; Shepherd, J.D.; Murphy, M.P.; Golde, T.E.; Kaye, R.; Metherate, R.; Mattson, M.P.; Akbari, Y.; LaFerla, F.M. Triple-transgenic model of Alzheimer's disease with plaques and tangles: Intracellular A beta and synaptic dysfunction. *Neuron* **2003**, *39*, 409–421. [[CrossRef](#)]

20. Andrau, D.; Dumanchin-Njock, C.; Ayral, E.; Vizzavona, J.; Farzan, M.; Boisbrun, M.; Fulcrand, P.; Hernandez, J.F.; Martinez, J.; Lefranc-Jullien, S.; et al. BACE1- and BACE2-expressing human cells: Characterization of beta-amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorimetric assay, and identification of new in vitro inhibitors. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 25859–25866. [[CrossRef](#)]
21. Umeda, T.; Tomiyama, T.; Sakama, N.; Tanaka, S.; Lambert, M.P.; Klein, W.L.; Mori, H. Intraneuronal amyloid beta oligomers cause cell death via endoplasmic reticulum stress, endosomal/lysosomal leakage, and mitochondrial dysfunction in vivo. *J. Neurosci. Res.* **2011**, *89*, 1031–1042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Del Prete, D.; Suski, J.M.; Oules, B.; Debayle, D.; Gay, A.S.; Lacas-Gervais, S.; Bussiere, R.; Bauer, C.; Pinton, P.; Paterlini-Brechot, P.; et al. Localization and Processing of the Amyloid-beta Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes. *J. Alzheimers Dis.* **2017**, *55*, 1549–1570. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Gerakis, Y.; Dunys, J.; Bauer, C.; Checler, F. Abeta42 oligomers modulate beta-secretase through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37436. [[CrossRef](#)]
24. Barbero-Camps, E.; Fernandez, A.; Baulies, A.; Martinez, L.; Fernandez-Checa, J.C.; Colell, A. Endoplasmic reticulum stress mediates amyloid beta neurotoxicity via mitochondrial cholesterol trafficking. *Am. J. Pathol.* **2014**, *184*, 2066–2081. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Checler, F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 1431–1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kaether, C.; Haass, C.; Steiner, H. Assembly, trafficking and function of gamma-secretase. *Neurodegener. Dis.* **2006**, *3*, 275–283. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Flammang, B.; Pardossi-Piquard, R.; Sevalle, J.; Debayle, D.; Dabert-Gay, A.S.; Thevenet, A.; Lauritzen, I.; Checler, F. Evidence that the amyloid-beta protein precursor intracellular domain, AICD, derives from beta-secretase-generated C-terminal fragment. *J. Alzheimers Dis.* **2012**, *30*, 145–153. [[CrossRef](#)]
28. Salminen, A.; Kauppinen, A.; Suuronen, T.; Kaarniranta, K.; Ojala, J. ER stress in Alzheimer's disease: A novel neuronal trigger for inflammation and Alzheimer's pathology. *J. Neuroinflamm.* **2009**, *6*, 41. [[CrossRef](#)]
29. Hoozemans, J.J.; Veerhuis, R.; Van Haastert, E.S.; Rozemuller, J.M.; Baas, F.; Eikelenboom, P.; Scheper, W. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2005**, *110*, 165–172. [[CrossRef](#)]
30. Hoozemans, J.J.; van Haastert, E.S.; Nijholt, D.A.; Rozemuller, A.J.; Eikelenboom, P.; Scheper, W. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am. J. Pathol.* **2009**, *174*, 1241–1251. [[CrossRef](#)]
31. Nishitsuji, K.; Tomiyama, T.; Ishibashi, K.; Ito, K.; Teraoka, R.; Lambert, M.P.; Klein, W.L.; Mori, H. The E693Delta 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.* **2009**, *174*, 957–969. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Kim, H.S.; Choi, Y.; Shin, K.Y.; Joo, Y.; Lee, Y.K.; Jung, S.Y.; Suh, Y.H.; Kim, J.H. Swedish amyloid precursor protein mutation increases phosphorylation of eIF2alpha in vitro and in vivo. *J. Neurosci. Res.* **2007**, *85*, 1528–1537. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Rutkowski, D.T.; Arnold, S.M.; Miller, C.N.; Wu, J.; Li, J.; Gunnison, K.M.; Mori, K.; Sadighi Akha, A.A.; Raden, D.; Kaufman, R.J. Adaptation to ER stress is mediated by differential stabilities of pro-survival and pro-apoptotic mRNAs and proteins. *PLoS Biol.* **2006**, *4*, e374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Stutzbach, L.D.; Xie, S.X.; Naj, A.C.; Albin, R.; Gilman, S.; Group, P.S.P.G.S.; Lee, V.M.; Trojanowski, J.Q.; Devlin, B.; Schellenberg, G.D. The unfolded protein response is activated in disease-affected brain regions in progressive supranuclear palsy and Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol. Commun.* **2013**, *1*, 31. [[CrossRef](#)]
35. Unterberger, U.; Hoftberger, R.; Gelpi, E.; Flicker, H.; Budka, H.; Voigtlander, T. Endoplasmic reticulum stress features are prominent in Alzheimer disease but not in prion diseases in vivo. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2006**, *65*, 348–357. [[CrossRef](#)]
36. Hashimoto, S.; Ishii, A.; Kamano, N.; Watamura, N.; Saito, T.; Ohshima, T.; Yokosuka, M.; Saido, T.C. Endoplasmic reticulum stress responses in mouse models of Alzheimer's disease: Overexpression paradigm versus knockin paradigm. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 3118–3125. [[CrossRef](#)]
37. Hashimoto, S.; Saido, T.C. Critical review: Involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer's disease. *Open Biol.* **2018**, *8*, 180024. [[CrossRef](#)]

38. Sadleir, K.R.; Popovic, J.; Vassar, R. ER stress is not elevated in the 5XFAD mouse model of Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 18434–18443. [[CrossRef](#)]
39. Pera, M.; Larrea, D.; Guardia-Laguarta, C.; Montesinos, J.; Velasco, K.R.; Agrawal, R.R.; Xu, Y.; Chan, R.B.; Di Paolo, G.; Mehler, M.F.; et al. Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *EMBO J.* **2017**, *36*, 3356–3371. [[CrossRef](#)]
40. Chang, R.C.; Suen, K.C.; Ma, C.H.; Elyaman, W.; Ng, H.K.; Hugon, J. Involvement of double-stranded RNA-dependent protein kinase and phosphorylation of eukaryotic initiation factor-2alpha in neuronal degeneration. *J. Neurochem.* **2002**, *83*, 1215–1225. [[CrossRef](#)]
41. Page, G.; Rioux Bilan, A.; Ingrand, S.; Lafay-Chebassier, C.; Pain, S.; Perault Pochat, M.C.; Bouras, C.; Bayer, T.; Hugon, J. Activated double-stranded RNA-dependent protein kinase and neuronal death in models of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **2006**, *139*, 1343–1354. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. O'Connor, T.; Sadleir, K.R.; Maus, E.; Velliquette, R.A.; Zhao, J.; Cole, S.L.; Eimer, W.A.; Hitt, B.; Bembinster, L.A.; Lammich, S.; et al. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* **2008**, *60*, 988–1009. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Devi, L.; Ohno, M. PERK mediates eIF2alpha phosphorylation responsible for BACE1 elevation, CREB dysfunction and neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 2272–2281. [[CrossRef](#)]
44. Chami, L.; Checler, F. BACE1 is at the crossroad of a toxic vicious cycle involving cellular stress and beta-amyloid production in Alzheimer's disease. *Mol. Neurodegener.* **2012**, *7*, 52. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Guarnaccia, S.P.; Shaper, J.H.; Schnaar, R.L. Tunicamycin inhibits ganglioside biosynthesis in neuronal cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1983**, *80*, 1551–1555. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Grimm, M.O.; Zinser, E.G.; Grosgen, S.; Hundsdorfer, B.; Rothhaar, T.L.; Burg, V.K.; Kaestner, L.; Bayer, T.A.; Lipp, P.; Muller, U.; et al. Amyloid precursor protein (APP) mediated regulation of ganglioside homeostasis linking Alzheimer's disease pathology with ganglioside metabolism. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e34095. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Lin, L.; Cao, J.; Yang, S.S.; Fu, Z.Q.; Zeng, P.; Chu, J.; Ning, L.N.; Zhang, T.; Shi, Y.; Tian, Q.; et al. Endoplasmic reticulum stress induces spatial memory deficits by activating GSK-3. *J. Cell Mol. Med.* **2018**, *22*, 3489–3502. [[CrossRef](#)]



Supplementary data

Supplementary material and methods

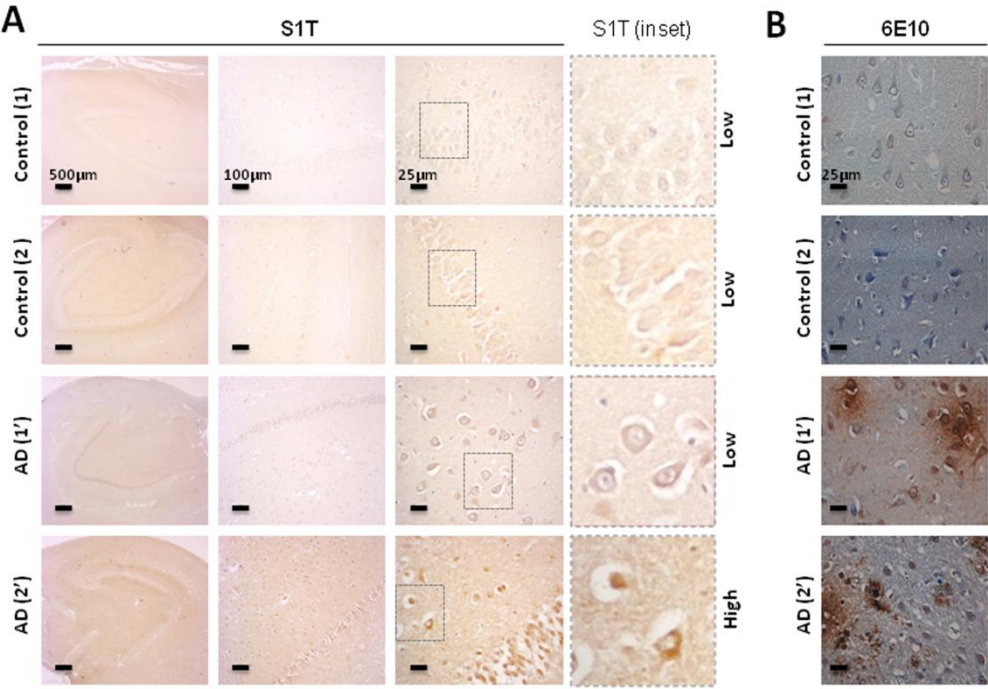
In vitro γ -secretase assay

In vitro γ -secretase assay was assessed as already described [44]. Twenty μ g of each subcellular fraction were resuspended in solubilization buffer (150mM sodium citrate pH 6.4 containing 3-[(3-cholamidopropyl) dimethylammonio]-2-hydroxy-1-propanesulfonate 1% (v/v)) supplemented with protease inhibitor mixture. All steps were performed at 4°C. Solubilized membranes were diluted once with sodium citrate buffer (150 mM pH 6.4), and with reaction buffer (150mM sodium citrate pH 6.4, 20mM dithiothreitol, 0.2mg/ml BSA, 1mg/ml egg phosphatidyl choline and 50 μ g/mL recombinant C100-FLAG). The resulting reaction mixes were then either incubated over constant agitation for 16h at 37°C or stored at 4°C (negative controls). Samples were then supplemented with 2x Tris-Tricine loading buffer, boiled for 5 min and subjected to 16.5% Tris-Tricine SDS-PAGE.

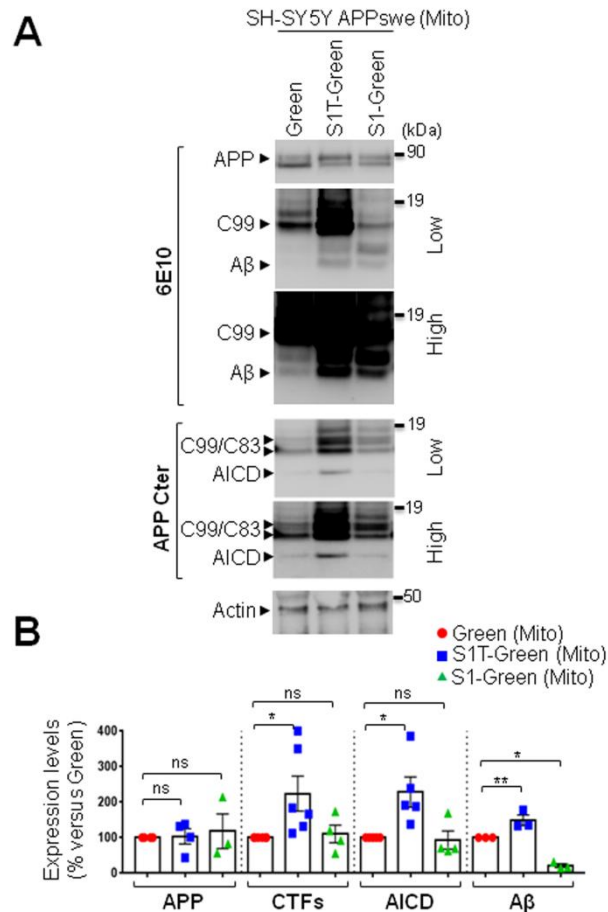
Tunicamycin treated mice

We used (C57BL6) Wild-type mice purchased from Charles River. Mice were housed in the specific-pathogen-free animal facility with a 12:12h light/dark cycle and were given free access to food and water. The experimental procedure was in accordance with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and local French legislation. Mice (12-14 week-old) were daily injected intraperitoneally for 3 days with either vehicle (0.03% DMSO, 0.02M Na₂HPO₄ buffer containing 150mM dextrose) or tunicamycin (1mg/kg, Merck) dissolved in the same vehicle. Brains were collected for biochemistry, RNA extraction, and immunochemistry.

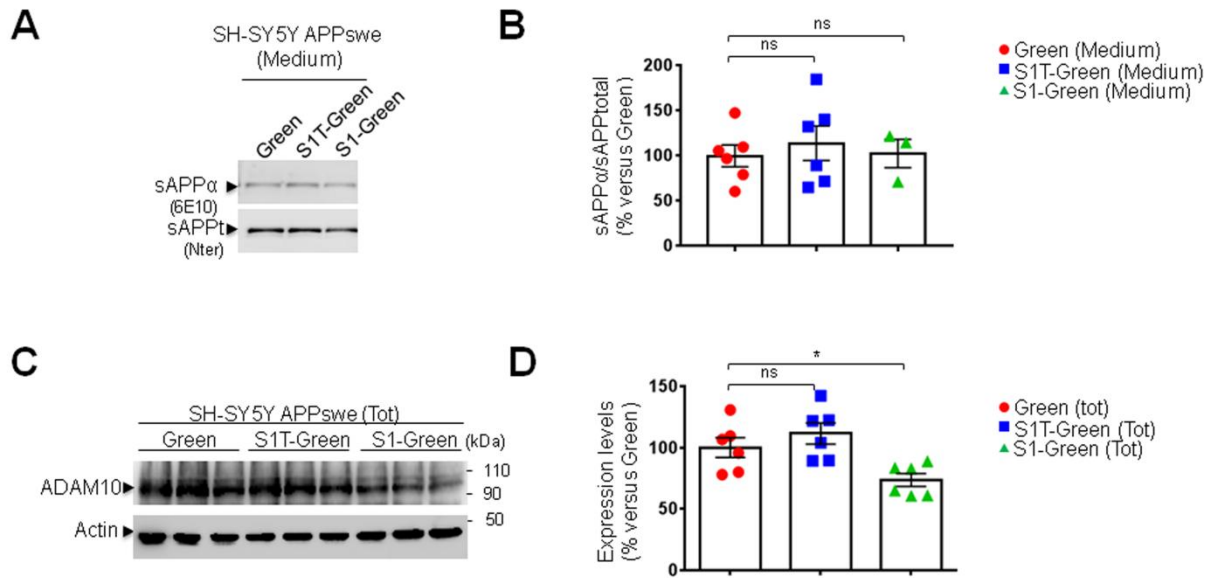
Supplementary Figures, legends to Figures and Tables



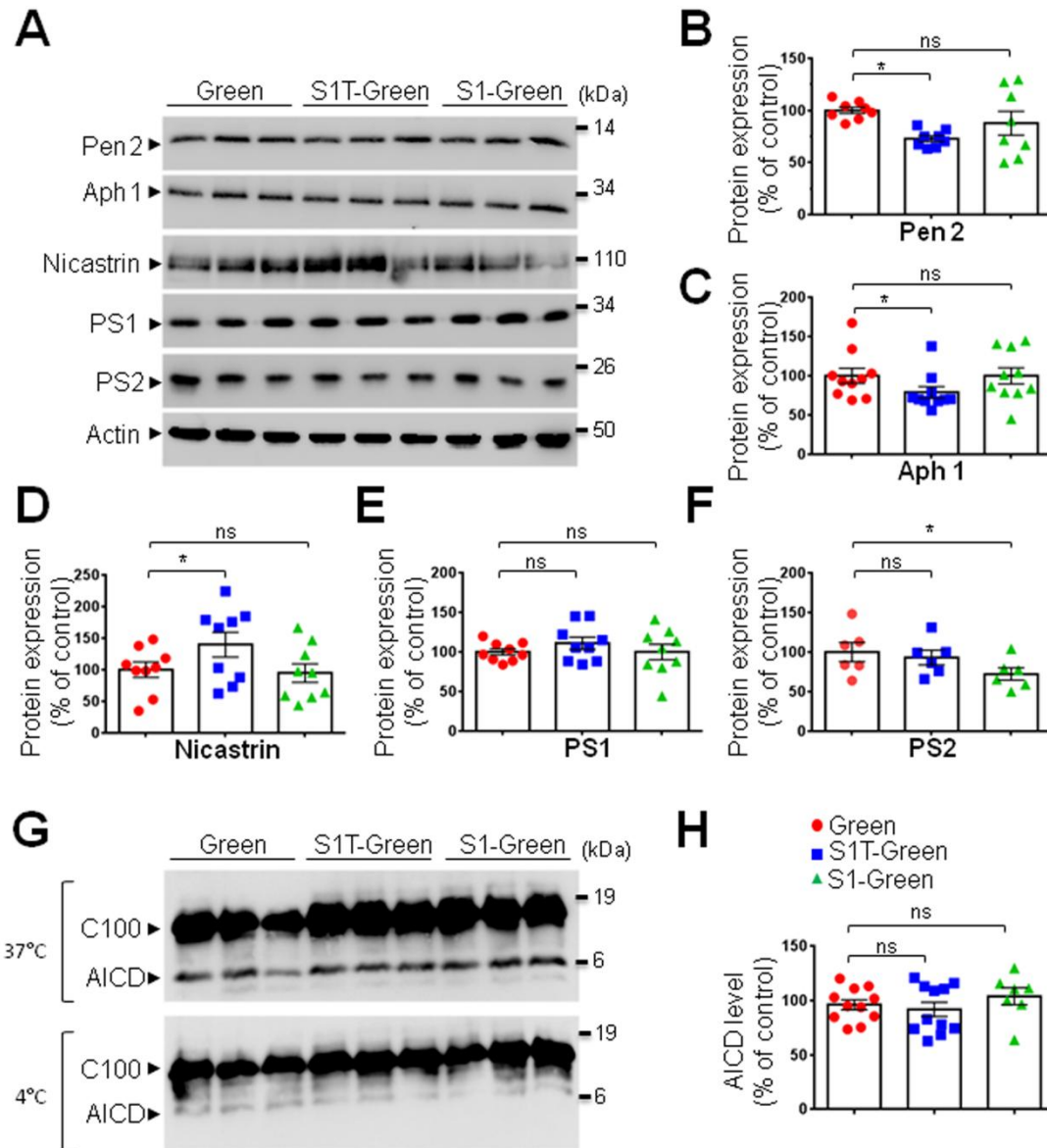
Supplementary Figure 1. Representative images showing S1T expression in the hippocampus of controls and human AD brain slices. S1T staining intensity and A β plaque type were analyzed in AD (n=6) and aged-matched non-demented control brains (n=4). Demographic data and neuropathological status of brain samples are reported in supplementary table 2. Nuclei were stained with Cresyl Violet dye on 6E10 stained slices. (A) S1T staining is shown in Control (1), Control (2), AD (1') and AD (2') (referenced in supplementary table 2) and are representative samples harboring low or high S1T immunostaining. Three different magnifications are shown. Scale bars 500, 100, and 25µm. The insets show S1T positive neurons. (B) Representative 6E10 staining in the brain sections obtained from the same patients.



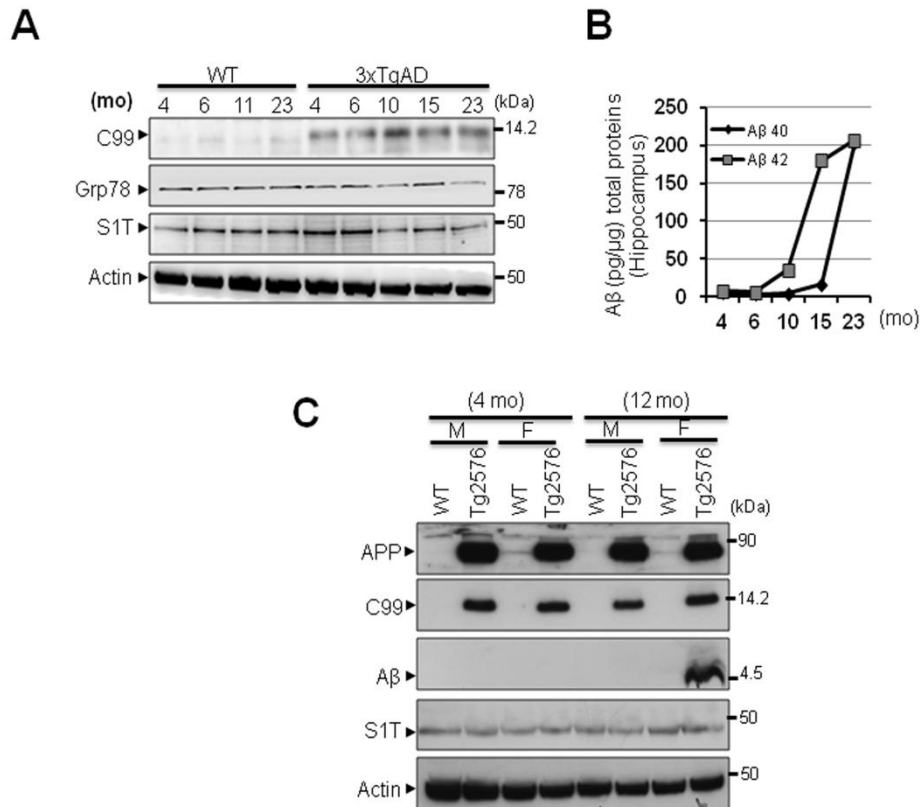
Supplementary Figure 2. S1T overexpression enhances β APP-derived catabolites accumulation in the mitochondria. (A) β APP and its-derived catabolites were detected in the mitochondrial enriched fraction isolated from SH-SY5Y APP^{swe} cells. β APP, the β -secretase-derived C-terminal APP fragment (C99), and A β were detected using 6E10 antibody. APP CTFs (C99 and α -secretase C-terminal APP derived fragment (C83)) and APP intracellular domain (AICD) were detected using an antibody recognizing the β APP C-terminal epitope (APP-Cter). Low and high exposures of representative SDS-PAGE are shown. Actin was used as loading control. (B) The graph represents means \pm SEM of APP, CTFs (C99, and C83), AICD and A β expression levels analyzed versus mean control values (Green) considered as 100% and obtained in more than 3 independent experiments. ** *p*-value <0.01, * *p*-value <0.5, and (ns) non-significant versus control using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test.



Supplementary Figure 3. S1T overexpression does not alter α -secretase expression and activity. (A) Representative SDS-PAGE showing the level of secreted APP α fragment (sAPP α) detected by 6E10 antibody versus total (sAPP α and sAPP β) fragments (sAPP β) detected using an antibody recognizing APP N-terminal epitope (APP-Nter). The same concentration of secreted proteins (in the medium) was loaded in each condition. (B) The graph represents the mean \pm SEM of sAPP α /sAPP β ratio versus the mean control values (Green) considered as 100% and obtained in at least 3 independent experiments. (ns) non-significant versus Green using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test. (C) Representative SDS-PAGE showing ADAM10 (constitutive α -secretase) expression in SH-SY5Y APP^{swe} cells transduced with Green, S1T-Green and SERCA1-Green lentiviral vectors as in Figure 3A. Actin was used as loading control. (D) The graph represents the mean \pm SEM of ADAM10 expression level obtained versus the mean control values (Green) considered as 100% and obtained in 6 independent experiments. * *p*-value <0.05, and (ns) non-significant versus Green using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test.

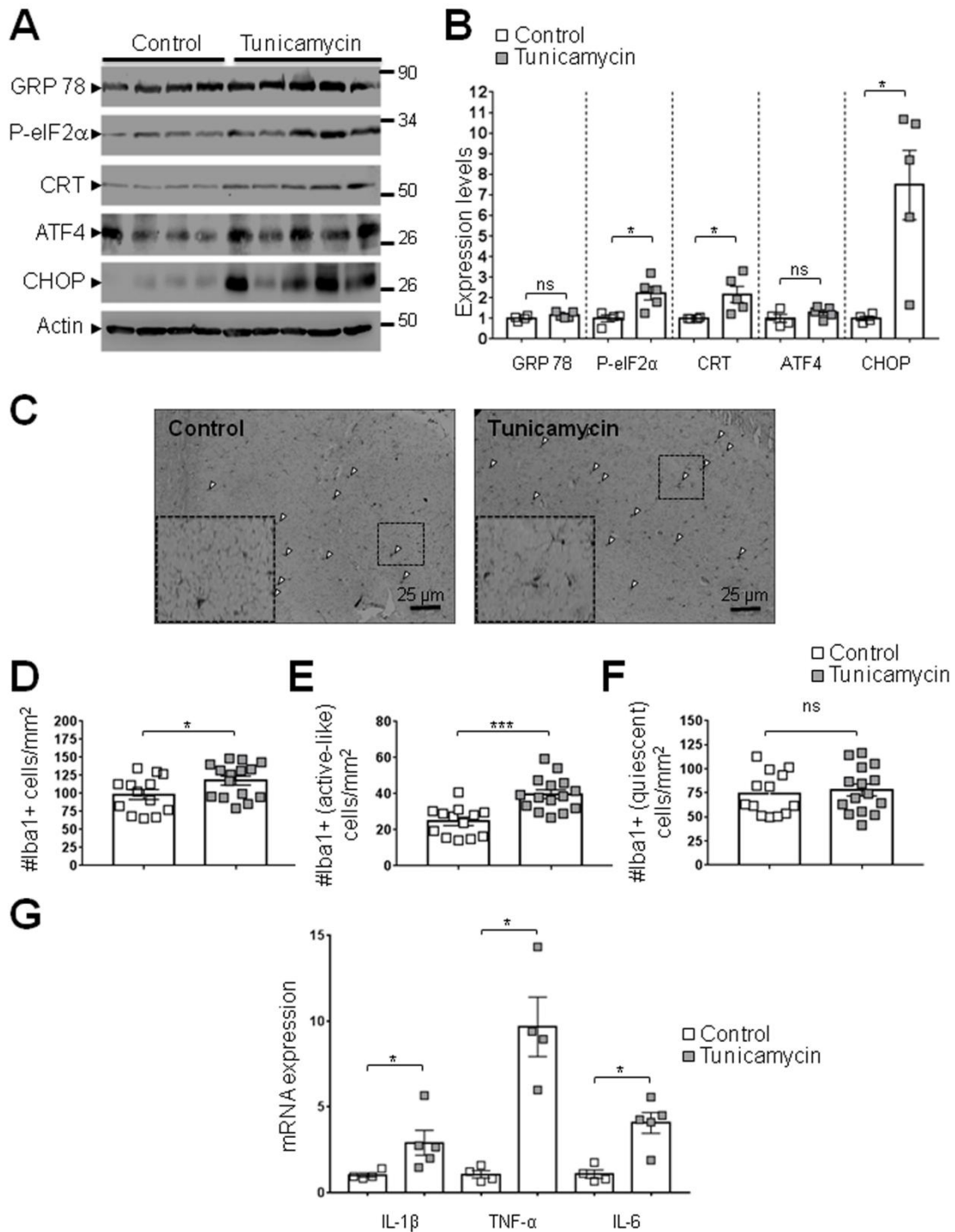


Supplementary Figure 4. S1T overexpression does not affect the expression and activity of γ -secretase complex. (A) Representative SDS-PAGE showing the expression of γ -secretase complex (Pen2, Aph1, Nicastrin, PS1 and PS2) in SH-SY5Y APPsw cells transduced with Green, S1T-Green or SERCA1-Green lentiviruses. (B-F) Graphs represent mean \pm SEM expression levels of Pen2 (B), Aph1 (C), Nicastrin (D), PS1 (E) and PS2 (F) versus mean control values (Green) considered as 100% and obtained in at least 4 independent experiments. * *p*-value <0.05, and (ns) non-significant versus Green using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test. (G) Cell-free AICD production from recombinant C100 peptide performed at 37°C or 4°C in the presence of membrane extracts isolated from APPsw cells expressing Green, S1T-Green or SERCA1-Green. C100 and AICD were detected using APP-Cter antibody. (H) The graph represents mean \pm SEM AICD level versus mean control values (Green) considered as 100% and obtained in at least 7 independent experiments. (ns) non-significant versus Green using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test.



Supplementary Figure 5. S1T expression is unchanged in mice AD brains. (A) SDS-PAGE showing the expression pattern of C99, GRP78, and S1T, in the hippocampus of WT (aged 4, 6, 11, and 23 months) and 3xTg-AD (aged 4, 6, 10, 15, and 23 months) mice. (B) Total (soluble and insoluble) Aβ40 and Aβ42 were quantified in 3xTg-AD by ELISA. (C) SDS-PAGE showing the expression pattern of full length APP, C99, Aβ, and S1T, in the cortex of male and females of WT and Tg2576 (aged 4, and 12 months) mice.

APP, C99 and Aβ were detected using 6E10 antibody. S1T was detected using a homemade antibody recognizing a specific epitope in S1T protein directed towards the COOH-terminal 10 amino acid generated by exon 11 splicing [13]. Actin was used as loading control (A, C).



Supplementary Figure 6. Tunicamycin administration induces ER stress and neuroinflammation *in vivo*. (A) Representative SDS-PAGE showing the expression pattern of glucose-regulated protein 78(GRP78), p-eIF2 α , Calreticulin (CRT), ATF4, and CHOP in the brain of control (n=4) and tunicamycin-treated mice (n=5). Actin was used as loading control. (B) Graph represents mean \pm SEM protein expression levels analyzed versus mean control values considered as 1. * *p*-value <0.05, and (ns) non-significant versus control using the Mann-Whitney test. C/ Representative images showing immunohistochemical staining of Iba1 in control or Tunicamycin-treated mice. Scale bar, 25 μ m. (D-F) The number of total (D), active-like (E), and quiescent (F) microglia were recorded in three fields in the hippocampus of treated mice as described in Figure 5. *** *p*-value <0.001, and * *p*-value <0.05, and (ns) non-significant versus control mice using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test. G/ RT-PCR

analysis of the mRNA expression of IL1- β , TNF- α , and IL-6 in the brain of control (n=4) and tunicamycin-treated mice (n=5). Genes were normalized for RNA concentrations with topoisomerase1 and GAPDH. The relative expression levels of mRNAs are represented as the mean \pm SEM versus the mean value in control mice. * *p-value* <0.05 versus control using the one-way ANOVA and Dunnett's post-test.

Supplementary Table 1: demographic data and neuropathological findings related to human temporal lobe (T1) samples used in immunohistochemistry analyses

	Age (years)	Gender	Braak's NFT stage [#]	A β deposits ^{##}	S1T staining ^{###}
Control	62	Female	-	0	Low
ALS	62	Female	-	0	Low
ALS (1)	55	Male	-	0	Low
ALS	68	Female	-	DP	Low
AD	77	Female	III	FP	High
AD	55	Female	IV	FP	High
AD (1')	65	Male	V	DP	Low
AD	84	Female	V	FP	High
AD	82	Male	V	FP	High
AD	80	Male	V	FP	High
AD (2')	86	Male	VI	FP	High
AD	63	Female	VI	FP	High
AD	79	Male	VI	FP	High

Control is brain sample isolated from a patient diagnosed as negative for several neuropathologies. ALS are control brains samples obtained from post-mortem patients diagnosed with Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). [#] Braak and Braak's NFT (neurofibrillary tangle: tau-related pathology) stage, (-) no NFT detection. ^{##} A β deposits (0: no deposits, DF: diffuse plaque staining, FP: focal plaque staining). ^{###} S1T immunostaining intensity was semiquantitatively classified as low or high as shown in representative images in Fig.1G. Representative images of S1T staining and of A β plaques immunostaining in the temporal lobe (T1) of control (1), AD (1'), and AD (2') are shown in Fig. 1G.

Supplementary Table 2: demographic data and neuropathological findings related to human hippocampus (H) samples used in immunohistochemistry analyses

	Age (years)	Gender	Braak's NFT stage [#]	A β deposits ^{##}	S1T staining ^{###}
Control (1)	62	Female	-	0	Low
ALS	62	Female	-	0	Low
ALS (2)	55	Male	-	0	Low
ALS	68	Female	-	DP	Low
AD	90	Male	III	FP	High
AD	84	Female	V	ND	Low
AD (1')	65	Male	V	DP	Low
AD	63	Female	VI	FP	Low
AD (2')	86	Male	VI	FP	High
AD	79	Male	VI	FP	High

Control is brain sample isolated from a patient diagnosed as negative for several neuropathologies. ALS are control brains samples obtained from post-mortem patients diagnosed with Amyotrophic lateral sclerosis (ALS). [#] Braak and Braak's NFT (neurofibrillary tangle: tau-related pathology) stage, (-) no NFT detection. ^{##} A β deposits (0: no deposits, DF: diffuse plaque staining, FP: focal plaque staining, ND: not determined). ^{###} S1T immunostaining intensity was semiquantitatively classified as low or high as shown in representative images in supplementary Fig.1. Representative images of S1T and A β plaques immunostaining in the hippocampus of control (1), and control (2), AD (1'), and AD (2') are shown in supplementary Fig. 1.

Supplementary Table 3: List of antibodies used in the study

Antibody	Host	Supplier	WB dilution	IF dilution
6E10 (1-16 aa of A β)	Mouse	Covance	1/1000	1/2000
β -APP CTFs (A8717)	Rabbit	Sigma Aldrich	1/1000	
APP N-terminal (22C11)	Mouse	Millipore	1/1000	
ATF4 (CREB-2) sc-200	Rabbit	Santa Cruz Biotechnologies	1/1000	
GRP78 (ab21685)	Rabbit	abcam	1/2000	
GRP94 (ab18055)	Rabbit	abcam	1/2000	
Calreticulin (C17)	Goat	Santa Cruz Biotechnologies	1/2000	
eIF2 α	Rabbit	Cell Signalling	1/2000	
P-eIF2 α (119A11)	Rabbit	Cell Signalling	1/2000	
Iba1	Rabbit	Wako, Fujifilm	-	1/1000
Aph1 (PA5-20318)	Rabbit	Thermo Scientific	1/2000	
PEN2 N-terminal	Rabbit	Millipore	1/2000	
BACE-1 (D10E5)	Rabbit	Cell signaling	1/2000	
Nicastrin	Rabbit	Sigma Aldrich	1/2000	
zsGreen	Rabbit	Clontech	1/2000	
ADAM10	Rabbit	Euromedex	1/1000	
SERCA2b (IID8)	Mouse	Affinity Bioreagents	1/2000	
SERCA1	Rabbit	Santa Cruz Biotechnologies	1/1000	1/50
CHOP (9C8)	Mouse	Thermo scientific	1/1000	
Pan-Neurofilament (SMI-311)	Mouse	abcam	1/1000	
TAU(AT8)	Mouse	Pierce	1/1000	
β -Actin	Mouse	Sigma Aldrich	1/5000	
GAPDH (A01)	Mouse	abnova	1/2000	
S1T	Rabbit	Homemaid [13]	1/1000	1/50

Supplementary Table 4: primer sequences used in the study

Gene	Primer	Sequences
GAPDH human	Sens	5'-AGCCACATCGCTCAGACAC-3'
	Antisens	5'-GCCCAATACGACCAAATCC-3'
GAPDH mouse	Sens	5'-AAGAGGGATGCTGCCCTTAC-3'
	Antisens	5'-CCATTTTGTCTACGGGACGA-3'
Topoisomerase human	Sens	5'-CCCTGTACTTCATCGACAAGC-3'
	Antisens	5'-CCACAGTGTCGGCTGTTTC-3'
Topoisomerase mouse	Sens	5'-TGCCTCCATCACACTACAGC-3'
	Antisens	5'-CGCTGGTACATTCTCATCAGG-3'
CHOP human	Sens	5'-CGACAGAGCCAAAATCAGAGC-3'
	Antisens	5'-CAGTGTCCGAAGAGAAAGGCAA-3'
GRP78 human	Sens	5'-GAAGCCCGTCCAGAAAGTGT-3'
	Antisens	5'-TTATGCCACGGGATGGTTCC-3'
S1T human	Sens	5'-TATCATTGACAAGGTGGATGGGGACAT-3'
	Antisens	5'-CTTGACAAACATCTTGTTGCCACAGCA-3'
Il1 beta mouse	Sens	5'-TGTAATGAAAGACGGCACACC-3'
	Antisens	5'-TCTTCTTTGGGTATTGCTTGG-3'
Il6 mouse	Sens	5'-CTACCAAACCTGGATATAATCAGGA-3'
	Antisens	5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGAA-3'
TNF alpha mouse	Sens	5'-TCTTCTCATTCCCTGCTTGTGG-3'
	Antisens	5'-GAGGCCATTTGGGAATTCT-3'

Annexe 4

Revue : « Dysfonctions moléculaires des sites de contacts entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (MAMs) dans la maladie d'Alzheimer. »

Molecular Dysfunctions of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) in Alzheimer's Disease.

Fanny Eysert*, Paula Fernanda Kinoshita*, **Arnaud Mary**, Loan Vaillant-Beuchot, Frédéric Checler, Mounia Chami.

(* co-premiers auteurs).

International Journal of Molecular Sciences

2020 Dec 14;21(24):9521. doi: 10.3390/ijms21249521.

<https://doi.org/10.3390/ijms21249521>

- *Cette revue liste les protéines impliquées dans les contacts entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique et leurs dysfonctions dans la maladie d'Alzheimer.*



Review

Molecular Dysfunctions of Mitochondria-Associated Membranes (MAMs) in Alzheimer's Disease

Fanny Eysert ^{1,†}, Paula Fernanda Kinoshita ^{1,2,†}, Arnaud Mary ¹, Loan Vaillant-Beuchot ¹, Frédéric Checler ¹ and Mounia Chami ^{1,*}

¹ Laboratory of Excellence DistAlz, INSERM, CNRS, Institut of Molecular and Cellular Pharmacology, Université Côte d'Azur, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France; eysert@ipmc.cnrs.fr (F.E.); kinoshita@ipmc.cnrs.fr (P.F.K.); mary@ipmc.cnrs.fr (A.M.); vaillant@ipmc.cnrs.fr (L.V.-B.); checler@ipmc.cnrs.fr (F.C.)

² Instituto de Ciências Biomédicas, Department of Pharmacology, Universidade de São Paulo, São Paulo 05508-900, Brazil

* Correspondence: mchami@ipmc.cnrs.fr; Tel.: +33-493953453

† Share first author position.

Received: 10 November 2020; Accepted: 8 December 2020; Published: 14 December 2020



Abstract: Alzheimer's disease (AD) is a multifactorial neurodegenerative pathology characterized by a progressive decline of cognitive functions. Alteration of various signaling cascades affecting distinct subcellular compartment functions and their communication likely contribute to AD progression. Among others, the alteration of the physical association between the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria, also referred as mitochondria-associated membranes (MAMs), impacts various cellular housekeeping functions such as phospholipids-, glucose-, cholesterol-, and fatty-acid-metabolism, as well as calcium signaling, which are all altered in AD. Our review describes the physical and functional proteome crosstalk between the ER and mitochondria and highlights the contribution of distinct molecular components of MAMs to mitochondrial and ER dysfunctions in AD progression. We also discuss potential strategies targeting MAMs to improve mitochondria and ER functions in AD.

Keywords: endoplasmic reticulum (ER); mitochondria; mitochondria-associated membranes (MAMs); Alzheimer's disease (AD); calcium signaling; phospholipids; cholesterol; fatty acid; lipids; unfolded protein response (UPR); APOE; tau; β amyloid precursor protein (APP); amyloid β peptide ($A\beta$); APP-C-terminal fragments (APP-CTFs)

1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a neurodegenerative disease characterized by two major histological hallmarks: (1) the neurofibrillary tangles (NFTs) corresponding to intracellular aggregates of abnormally hyperphosphorylated Tau protein (pTau) and, (2) senile plaques that are mainly composed of extracellular aggregates of β amyloid peptide ($A\beta$) derived from the sequential cleavage of its precursor, the amyloid precursor protein (APP), by β -secretase and γ -secretase enzymes [1,2]. Late-onset AD (LOAD) cases are considered to be sporadic (SAD) accounting for the majority of AD cases. For a long time, apolipoprotein E (APOE) has been described as the sole and main genetic risk factor for LOAD forms [3]. Recently, a genome wide-association study (GWAS) identified several new AD genetic risk factors [4–6]. Dominantly inherited familial AD (FAD) accounts for less than 1% of the cases and can be caused by mutations in *APP*, *presenilin 1* (*PS1*), or *presenilin 2* (*PS2*) genes [7,8]. Overall, AD is now considered a complex pathology, the mechanistic defects of which remain unclear. The amyloid cascade is the most widely accepted hypothesis in AD and proposes $A\beta$ accumulation as the etiological

trigger of the pathology. This has been supported by genetic evidence demonstrating that FAD mutations in genes coding for APP or its processing enzymes (PS1 and PS2) constituting the catalytic components of the γ -secretase enzymatic complex [9] lead to increased production and secretion of A β peptides [9]. The latter accumulate in the form of neurotoxic A β oligomers (A β o) and are thought to trigger several stress responses in neurons leading to the onset of neurofibrillary degeneration [9]. Several therapeutic approaches were developed with the aim to reduce the accumulation of A β through active and passive immunizations. However, the failure of these trials to rescue cognitive declines or even stabilize them [10] casts some doubts about the amyloid cascade hypothesis. Notably, the sole contribution of A β to AD pathogenesis is challenged, since APP processing yields several fragments besides A β [2]. In physiological conditions, 90% of mature APP is cleaved by α -secretase at the plasma membrane, producing the secreted soluble α -APP (sAPP α) and the membrane-anchored APP-C-terminal (APP-CTF) α fragment (C83). The latter is further cleaved by γ -secretase producing p3 and AICD (APP intracellular domain) peptides. On the other hand, 10% of mature APP is cleaved by β -secretase (BACE1) following its internalization towards the endosomal/lysosomal pathway, producing the soluble β -APP (sAPP β) released in the extracellular environment, and the membrane-anchored APP-CTF β fragment (C99), which is further cleaved by γ -secretase producing AICD and A β peptides [2]. C99 is also cleaved by α -secretase to produce C83 [11]. Furthermore, other APP-derived fragments produced by other enzymes (such as η - and δ - secretases) were recently described [12–14], likely contributing to AD pathophysiology [12–18].

Both the endoplasmic reticulum (ER) and mitochondria are vital organelles of the cell. Rough and smooth ER participate in protein synthesis, folding, and transport. The ER is also involved in other fundamental cellular functions such as lipids- and carbohydrates- metabolism and is the major calcium (Ca²⁺) storage pool [19]. On the other hand, mitochondria act as the powerhouse of the cell by generating energy through adenosine triphosphate (ATP) production [20]. Besides, mitochondria play a major role in buffering the Ca²⁺ flux from the ER, but also in lipid- and amino acid- metabolism, beneficial and harmful reactive oxygen species (ROS) production, and apoptosis [20]. It is now well established that ER and mitochondria functions are highly interconnected. They physically interact to form specific microdomains called mitochondria-associated ER membranes (MAMs), where the outer mitochondrial membrane (OMM) is close to the ER in the order of 10–100 nanometers [21–23]. The maintenance of stable contact sites between the ER and mitochondria provides a platform for bidirectional crosstalk. Not surprisingly, MAMs control intracellular elementary events such as Ca²⁺ homeostasis, metabolic flow, protein transport [24], mitochondrial lipids production, phospholipid biosynthesis, mitochondrial fusion and fission, and global events such as autophagy and apoptosis [25] (Figure 1). In addition, MAMs are a hot-spot for the transfer of stress signals from the ER to mitochondria, particularly under ER stress conditions activating the unfolded protein response (UPR) [26] (Figure 1). As a result, one can argue that the alteration of ER and mitochondria communication may influence and disrupt these functions, thus leading to the development of several pathologies and vice-versa.

ER stress and mitochondrial dysfunctions occur early in AD, likely contributing to disease progression and irreversible neuronal death [27–30]. Numerous papers reported that several pathogenic paradigms associated with AD are closely linked to MAMs structure and function alterations. This review aims at delineating the contribution of several structural and functional partners of MAMs (i.e., Mitofusins (MFNs), Protein Kinase-like Endoplasmic Reticulum Kinase (PERK), the serine/threonine-protein kinase/endoribonuclease inositol-requiring enzyme 1 α (IRE1 α), and the sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase 1 (SERCA) truncated isoform (S1T)), and MAMs complexes (i.e., IP₃R-Grp75-VDAC, PACS2-PSS1, BAP31-FIS1-DRP1, VAPB-PTPIP51, and Sig-1R-Grp78) (Figure 2) in pathophysiological processes of AD. We also elucidate how AD associated proteins (APP and its derived fragments, PSs, Tau, and APOE) may impact MAMs structure and function (Figure 3). Finally, we highlight the potential relevance of MAMs molecular components as therapeutic targets to prevent the development of AD.

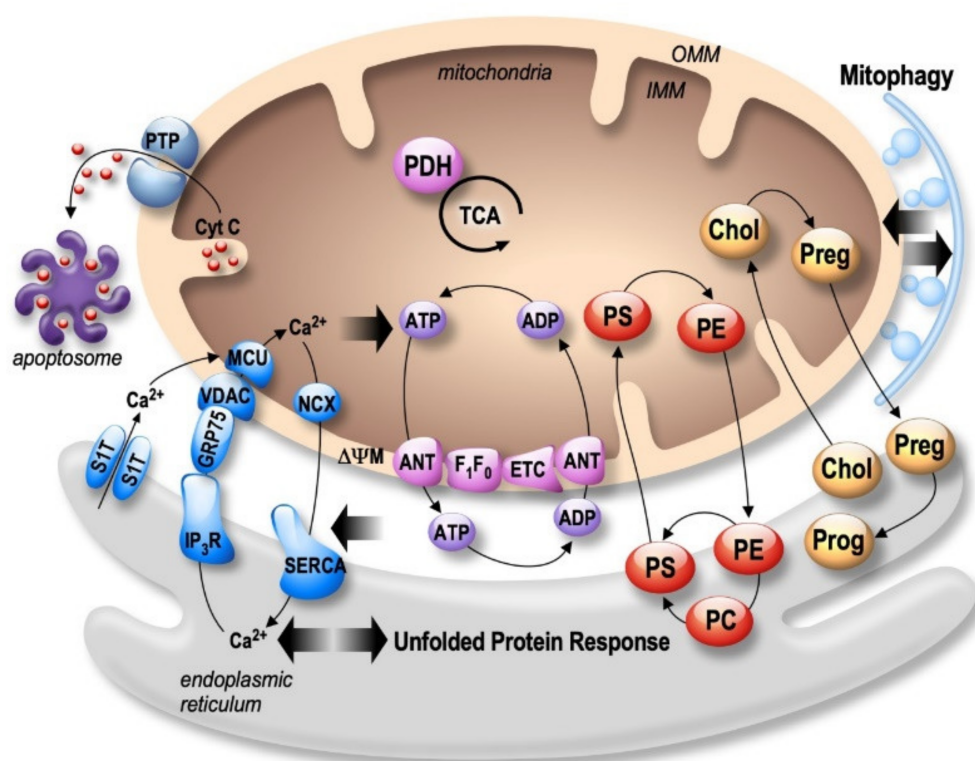


Figure 1. Bidirectional regulation of ER and mitochondria functions in MAMs. Mitochondria Ca^{2+} uptake (i.e., by the VDAC (voltage-dependent anion channel) located in the outer mitochondria membrane (OMM) and the mitochondrial Ca^{2+} uniporter complex (MCU) located in the inner mitochondria membrane (IMM)) increases the activity of mitochondrial enzymes (i.e., the pyruvate dehydrogenase (PDH), and the tricarboxylic acid cycle (TCA)) orchestrating the activity of the oxidative phosphorylation electron transport chain (ETC) producing ATP by the F1F0 ATP-synthase. ATP is then transported through the adenine nucleotide translocator (ANT). In return, ATP is used by the sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase (SERCA) ensuring active Ca^{2+} storage in the ER, necessary for ER functions (i.e., protein synthesis and maturation). Mitochondrial Ca^{2+} homeostasis results from an equilibrium between Ca^{2+} uptake and extrusion by the $\text{Na}^{2+}/\text{Ca}^{2+}$ exchanger (NCX). Prolonged or excessive mitochondrial Ca^{2+} uptake triggers mitochondrial membrane permeability transition pore (PTP) opening, initiating cytochrome c (Cyt c) release, apoptosome formation, and the activation of apoptotic cell death. In particular, altered ER Ca^{2+} homeostasis is associated with the unfolded protein response (UPR), triggering excessive transfer of Ca^{2+} from the ER to mitochondria (i.e., through SERCA1 truncated isoform (S1T), or the inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3R)), which is tightly linked to ER stress-mediated mitochondria apoptotic cell death. In parallel, MAMs control phospholipids biosynthesis and transfer between organelles where phosphatidylcholine (PC); phosphatidylethanolamine (PE); and phosphatidylserine (PS) are the most abundant ones. MAMs are also the intersection site of transport and metabolism of cholesterol (Chol), which is catalyzed to generate pregnenolone (Preg) and released to the ER to produce progesterone (Prog). MAMs-associated lipid microdomains regulate the autophagic/mitophagic processes through the recruitment of autophagic proteins and autophagosome formation.

2. Structural and Functional Partners of MAMs Are Involved in AD

2.1. Mitofusins: MFNs

Mitofusins (MFN1 and MFN2) belongs to GTPases family and are located in the OMM. Both MFNs are involved in mitochondrial fusion process by forming homotypic and heterotypic interactions with the inner mitochondria membrane's (IMM) OPA1 protein [31,32]. Besides, several studies proposed that MFN2 modulates mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) through the regulation of nuclear-encoded

subunits of OXPHOS complexes I, II, III, and V [33]. MFN2 acts as a regulator of apoptosis in a cell type- and age-specific manner [34,35], and is linked to mitophagy [36]. The importance of MFN2 in organelles juxtaposition and the communication function of MAMs has been also proven through the regulation of mitochondria Ca^{2+} uptake [37]. MFN2 was also shown to be involved in dendritic outgrowth, spine formation in mice models, and to prevent neurodegeneration in the cerebellum through fusion mechanism [38].

Several studies reported that MFN2 is associated with AD [39] (Figure 2 and Table 1). MFN2 gene polymorphisms were reported in LOAD [40]. Moreover, the mitochondrial fusion and fission balance is altered in AD, correlating with enhanced or reduced MFNs expression [41]. A reduction of both MFN1 and MFN2 expression was reported in human AD brains [41,42]. Accordingly, a reduction of MFN2 expression was also reported in N2a cells expressing the APP familial Swedish mutation (APP^{swe}) that overproduces $\text{A}\beta$ [43]. On the contrary, an overexpression of MFN2 was observed in human cybrid cells in which mitochondria from mild cognitive impairment (MCI) subjects were incorporated into neuronal cells depleted of endogenous mitochondrial DNA [44]. These discrepancies may point out a complex regulation of MFN2 in AD pathogenesis. In fact, directly linked to APP processing in AD, MFN2 was shown to control γ -secretase activity and $\text{A}\beta$ production by modulating ER and mitochondrial membrane contacts, without affecting BACE1 and neprilysin expression [45]. Moreover, PS2-linked FAD mutants promote ER-mitochondria coupling in a MFN2-dependent manner (Table 1) [46]. Altogether, these studies highlight a central role of MFN2 in AD pathogenesis through the regulation of MAMs tethering, mitochondrial structure and function, and cell death but also APP processing.

2.2. *IP₃R-Grp75-VDAC*

The inositol 1,4,5-trisphosphate receptors (IP_3Rs), releasing Ca^{2+} from the ER to the cytosol [47], are enriched in ER-mitochondria contact sites playing a key role in cellular differentiation, survival, and apoptosis [48,49]. Ca^{2+} uptake by mitochondria occurs through VDAC, an OMM protein which is a permeable Ca^{2+} channel, together with the mitochondrial Ca^{2+} uniporter (MCU) complex [50] located on the IMM (Figure 1). In MAMs, a functional complex between VDAC (isoform 1) and IP_3R (isoform 3) is formed through a chaperone called glucose-regulated protein 75 (Grp75, a member of the heat shock protein 70 family) [51]. The $\text{IP}_3\text{R-Grp75-VDAC}$ complex regulates Ca^{2+} transfer from the ER to mitochondria, suggesting its involvement in Ca^{2+} homeostasis deregulation largely described in AD [51]. While there is only one study documenting a reduction of Grp75 expression in the temporal and parietal cortex of AD post-mortem brains [52], several studies demonstrated alterations of VDAC expression in AD (Figure 2 and Table 1). VDAC1 expression increases progressively according to AD stages in the cortex of post-mortem brains, in aged APP mice, and also in neuroblastoma cells treated with $\text{A}\beta$ [53]. Accordingly, another study reported that $\text{A}\beta$ treatment of primary hippocampal neurons increased VDAC1 and IP_3R expression, resulting in enhanced contacts between ER and mitochondria [54]. VDAC1 also interacts with $\text{A}\beta$ and pTau, likely contributing to mitochondrial dysfunction [55]. In turn, $\text{A}\beta$ triggers VDAC dephosphorylation in lipid rafts in AD brains correlating with cell death [56]. Inversely, reduced expression of VDAC1 decreased the mRNA levels of APP, Tau, PS1 and PS2, and also BACE1 [57].

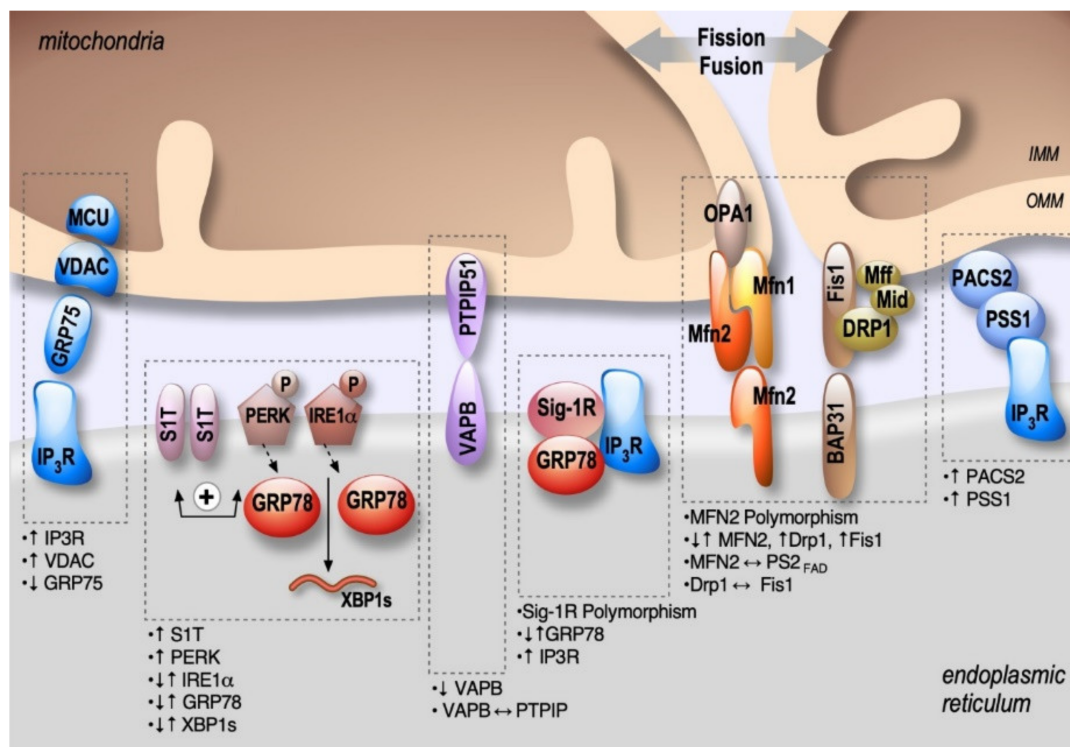


Figure 2. Schema showing the localization and alterations of MAMs molecular components in AD, including upregulation (↑) or down-regulation (↓) of MAMs proteins expression, MAMs proteins interactions (↔), and genes polymorphism.

Alterations of IP₃R expressions and activity have been largely explored in AD and were demonstrated to be linked to both A β and PS1 and PS2 FAD mutations. Fibroblasts from FAD patients exhibited an enhanced response to bombesin- and bradykinin-mediated IP₃ generation in comparison to control cells [58]. These data were further confirmed in cortical and hippocampal neurons from 3xTgAD mice [59]. A β o are also involved in IP₃R overactivation by increasing IP₃ production and triggering cytotoxicity [60]. Importantly, the reduction of IP₃R1-mediated Ca²⁺ release in the cortical and hippocampal neurons of PS1M146V and 3xTgAD mice reduces ryanodine receptor (RyR)-mediated Ca²⁺ release, restores cAMP response element-binding (CREB)-dependent gene expression, rescues long-term potentiation (LTP) to normal levels, attenuates A β accumulation and pTau and reverses memory deficits [61]. Another study also showed a physical interaction of IP₃R with PS1 (M146L) and PS2 (N141I) mutants stimulating IP₃R gating activity [62] (Figure 2 and Table 1). Of note, our laboratory and others reported a major role of enhanced RyR expression and activity in AD [63–68]. Nevertheless, dedicated studies are still needed to demonstrate if the interaction between IP₃R and FAD PSs mutants occurs preferentially in MAMs and to unravel the physiopathological contribution of RyRs in MAMs dysfunction related to AD.

2.3. PACS2-PSS1

Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2 (PACS2) is a multifunctional sorting protein that interacts with several cargo proteins and regulates their location in MAMs [69]. PACS2 controls apoptosis induction, through the translocation of Bim (Bcl-2-like protein 11) to lysosomes [70], or Bid (BH3 interacting domain) to mitochondria [71]. The precise localization of PACS2 in MAMs is still uncertain. However, it has been demonstrated that PACS2 controls ER-mitochondrial apposition through its tethering action and is also involved in Ca²⁺ transfer from ER to mitochondria through IP₃R localization [71]. Accordingly, PACS2 deletion leads to decreased ER-mitochondria contacts and triggers mitochondria fragmentation [71] and apoptosis [72].

PSS1 (phosphatidylserine synthase-1) is synthesized and specifically located in MAMs, supporting the direct transfer of lipids between ER and mitochondria [73]. PACS2 and PSS1 are functionally linked, since the overexpression of PACS2 raises the levels of PSS1 in MAMs [71].

PACS2 and PSS1 regulations in AD were reported in a study by Hedskog et al. showing enhanced PACS2 and PSS1 protein levels in AD transgenic mice expressing Swe/LDN FAD mutations [54]. More precisely, PACS2 protein expression was enhanced in the hippocampus of 2 month-old aged mice before A β plaque formation, and in the cortex and the cerebellum at 6 months. Meanwhile, PSS1 protein expression was only enhanced in the cerebellum starting at 6 months. Importantly, the authors also revealed enhanced PSS1 and PACS2 protein levels in human SAD brains (Figure 2 and Table 1). Enhanced PSS1 and PACS2 protein expressions were not corroborated by an increase in PSS1 and PACS2 mRNAs levels, suggesting that the regulation of PSS1 and PACS2 expressions in AD occurs at the protein level only. The authors also reported unchanged phospholipid metabolism in both mice and AD brains, thus questioning the functional consequences related to enhanced PSS1 and PACS-2 protein expression. Nevertheless, ablation of PSS2 triggers degeneration of astrocytes and neuronal hippocampal primary cultures. In conclusion, this unique study unravels the potential contribution of an additional MAMs molecular component in AD [54].

2.4. BAP31-FIS1-DRP1

Another physical tether of MAMs has been described as the interaction between the resident integral ER protein B cell receptor-associated protein 31 (BAP31) and the OMM mitochondrial FIS1 protein involved in the initiation of mitochondrial fission process [74,75]. FIS1 interacts with dynamin-related protein1 (DRP1) after its recruitment at mitochondrial fission sites by the OMM receptors (Mff, Mid49 and Mid51) in the MAMs complex, including BAP31 [76]. Intriguingly, a recent study reported that the human FIS1 protein can cause mitochondrial fragmentation in the absence of DRP1 and Dyn2 GTPases through its ability to bind to MFN1, MFN2, and OPA1, also inhibiting the mitochondrial fusion [77]. Shen et al. also demonstrated that mutations in the *FIS1* gene do not cause defects in mitochondrial fission in response to fission-inductor chemical treatments but trigger persisting large aggregates of autophagosomes [76]. Accordingly, FIS1 KO MEFs cells display a strongly impaired mitophagy [78]. Iwasawa et al. showed that FIS1 conveys an apoptosis signal from the mitochondria to the ER through its interaction with BAP31 at the ER and its cleavage into the pro-apoptotic p20 [74]. The latter triggers a Ca²⁺ transfer from the ER to the mitochondria leading to $\Delta\Psi_m$ depolarization, hence priming cell death induction [74,75]. BAP31 is also essential for mitochondrial homeostasis as it stimulates the formation of the mitochondrial complex I [79].

Several studies reported that FIS1, BAP31, and DRP1 may contribute individually to AD physiopathology (Figure 2 and Table 1). It was first reported that the mRNA and protein levels of FIS1 and DRP1 are increased in the frontal cortex of patients with early, definite, and severe AD [42]. Joshi et al. reported later that A β_{42} -treated neurons and fibroblasts from SAD or FAD patients feature an increased interaction between DRP1 and FIS1, which causes mitochondrial dysfunctions attested by increased mitochondrial fragmentation, oxidative stress, decreased $\Delta\Psi_m$ and ATP levels, and increases in the activity of pro-apoptotic enzymes and Cyt c release [80]. Most importantly, inhibiting the DRP1-FIS1 interaction corrects these mitochondrial impairments, reduces in the 5xFAD mice AD model (that overexpress human APP and PS1 transgenes with a total of five AD-linked mutations) cognitive defects, A β_{40} and A β_{42} levels, and oxidative stress, and increases ATP levels [80]. In parallel, BAP31 knockdown in the hippocampus and the cerebral cortex of PS1 M146V mice results in an increased BACE1 protein level, exacerbating C99 accumulation and A β plaque formation [81]. Other studies showed that pTau and A β monomers and oligomers can also directly interact with Drp1 in AD late stages, likely contributing to abnormal mitochondrial dynamics [42,82]. Moreover, A β also triggers nitric oxide production, likely contributing to Drp1 S-nitrosylation-mediated mitochondrial fragmentation and neuronal damage [83] (Figure 2 and Table 1). Together, these studies support the involvement of the BAP31-FIS1-DRP1 complex in AD pathology.

2.5. VAPB-PTPIP51

The OMM protein, tyrosine phosphatase-interacting protein-51 (PTPIP51), was identified as a binding partner for the resident ER protein vesicle-associated membrane protein-associated protein-B (VAPB) [84]. As a physical tether of MAMs, VAPB has several functions, including vesicle trafficking and UPR [84]. It was then demonstrated that the loss of either VAPB or PTPIP51 perturbs the uptake of Ca^{2+} by mitochondria, decreasing ATP production [85] and stimulating the formation of autophagosomes [86]. Additionally, PTPIP51 can interact with the oxysterol-binding protein (OSBP)-related proteins ORP5 and ORP8 in MAMs [87], likely contributing to phosphatidylserine (PS) transport between ER and mitochondria.

VAPB P56S mutation is associated with dominantly inherited familial forms of type-8 amyotrophic lateral sclerosis (ALS) [88]. Moreover, TAR DNA binding protein 43 (TDP-43) and fused in sarcoma (FUS), two ALS/frontotemporal dementia (FTD)-associated proteins, were reported to activate the glycogen synthase kinase-3 β (GSK-3 β), which inhibits VAPB-PTPIP51 binding, ultimately resulting in disrupted Ca^{2+} homeostasis and reduced ATP production [85,89]. Strikingly, it has recently been observed that AD patients with granulovacuolar degeneration bodies (GVB) feature lower VAPB level [90] (Figure 2 and Table 1). Interestingly, AD is a pathology where TDP-43 and FUS accumulate in stress granules and GVB. Furthermore, GSK-3 β is also overactivated in AD [91]. A recent study reports a reduction of VAPB and PTPIP51 interaction in the pyramidal cortex of patients with early/mid dementia, and a reduction of the expression of both VAPB and PTPIP51 in the cortex of AD patients at late-stages [92]. Together, these studies also suggest the involvement of VAPB-PTPIP51 physical/or functional alterations in AD pathophysiology.

2.6. Sig-1R-Grp78

Sigma non-opioid intracellular 1-receptor 1 (Sig-1R) is a chaperone protein present in ER lipid rafts that interacts and modulates different proteins in ER and plasma membrane [93]. Sig-1R is essential for MAMs stability [94], and is implicated in lipid synthesis and trafficking [95].

Grp78 (or BiP), a member of the heat shock protein 70 family, is a chaperone and an ER stress sensor [96]. Importantly, Grp78 is present in MAMs, where it folds the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) transporting cholesterol for delivery to the OMM [97]. Under ER stress conditions, Grp78 dissociates from and activates three branches of the UPR: activating transcription factor 6 (ATF6), IRE1 α , and PERK. The UPR generates an adaptive or a pro-apoptotic response according to the stress duration and/or intensity [98]. In aging, the pro-apoptotic response becomes more common than the adaptive pathway, probably due to a failure in chaperone systems [98]. Interestingly, the impairment in UPR, apoptosis, and accumulation of misfolded proteins are common features of AD and other neurodegenerative diseases [99]. Despite this, there is still no consensus on the role of Grp78 in AD. While APP/PS1 mice and A β_{25-35} treated neurons presented increased Grp78 expression (reviewed in Reference [100]), another study in AD post-mortem brains with PS1 mutations showed a reduction in Grp78 mRNA levels [101]. Recently, a study demonstrated that the 5xFAD mice had no changes in Grp78 expression and other ER stress-related proteins [102]. These discrepancies could be linked to the pleiotropic functions regulated by and regulating Grp78 expression (Figure 2 and Table 1).

Sig-1R forms a complex with Grp78 in MAMs under resting conditions [103]. During ER stress, Sig-1R also dissociates from Grp78 and forms a complex with IP₃R through ankyrin B to increase Ca^{2+} signaling from ER to the mitochondria, thereby enhancing ATP synthesis [104]. Besides, Sig-1R stimulates phospholipase C (PLC) that increases IP₃ levels, resulting also in Ca^{2+} release from the ER [105]. The activation of Sig-1R is considered neuroprotective since Sig-1R silencing in hippocampal neurons results in Cyt c release, caspase-3 activation, and a deficit in spine formation. Remarkably, this mechanism is reversed by superoxide dismutase activation, showing that the reduction of Sig-1R increases the levels of ROS [106].

Interestingly, Sig-1R has been associated with a variety of neurodegenerative diseases, including AD [107,108]. Reduced Sig-1R binding sites were reported in AD post-mortem brains [109]. It has

also been proposed that a polymorphism in Sig-1R (TT-P) correlates with the risk of developing AD [110]. This finding has been challenged in another study demonstrating that another Sig-1R polymorphism (Q2P) may worsen clinical outcomes only in association with the genetic risk factor APOE ϵ (epsilon)4 [111]. The protective effect of Sig-1R has also been observed in two AD mice models (3xTg-AD and MacGill-R-Thy1-APP), where the treatment with a Sig-1R agonist, named AF710B (a concomitant agonist of the muscarinic 1 receptor), have been shown to restore cognitive impairment, and to reduce amyloid pathology and neuroinflammation [112,113]. Accordingly, the silencing of Sig-1R or application of the Sig-1R antagonist (NE-100) aggravated the pathological status in A β ₂₅₋₃₅ treated mice (i.e., learning deficits, reduced BDNF levels, and enhanced expression of Bax) [114]. The treatment of A β ₂₅₋₃₅ injected mice with ANAVEX2-73, another agonist of Sig-1R, decreases pTau, Bax/Bcl-2 ratio, lipid peroxidation, C99 accumulation, and Cyt c release [115,116], while decreasing Sig-1R expression enhances Tau hyperphosphorylation and reduces dendritic spines formation [117].

Overall, these studies converge to demonstrate the neuroprotective effect of Sig-1R agonists, acting through a diversity of Sig-1R-mediated signaling functions that are generally pro-survival and anti-apoptotic.

2.7. Protein Kinase-Like Endoplasmic Reticulum Kinase: PERK

Several studies reported that the activation of the PERK pathway attenuates protein synthesis until the unfolded protein accumulation is removed [98]. Interestingly, PERK is enriched at MAMs [118], where it facilitates the tethering of the ER to mitochondria and sensitizes cells to apoptosis [118,119]. PERK KO cells show reduced MAMs and disturbed cytosolic Ca²⁺ signaling and also protect cells from ROS-induced mitochondrial dysfunction [118]. A recent study demonstrates that PERK localized in MAMs phosphorylates mitochondrial E3 ubiquitin ligases and decreases the formation of mitochondria-associated ER membranes under ER stress condition [120]. UPR occurs relatively early in AD, and PERK was shown to be activated in human AD-derived brains [121,122]. The dysregulated PERK pathway has been recapitulated in AD mice models that develop β -amyloidosis [123–125], Tau-mediated neurodegeneration [126,127], and in SAD genetic risk factor APOE ϵ 4 mice models [128] (Figure 2 and Table 1). Several studies have provided mechanistic insights into the direct relationship between PERK overactivation and several paradigms occurring in AD. The phosphorylation of eIF2 α , occurring down-stream of PERK activation, has been shown to increase BACE1 expression, thereby enhancing the production of A β in neurons [129], and genetic reduction of PERK reduces BACE1 protein level and A β production in the 5xFAD mouse model [123]. Accordingly, the selective ablation of PERK improved the synaptic plasticity and spatial memory in mice harboring APP and PS1 mutations [124], consistent with the requirement for active protein translation in memory consolidation [130]. Another study demonstrated that a reduction in eIF2 α phosphorylation enhances the late phase of LTP and memory in mice [131]. Furthermore, the local expression of ATF4 (a transcription factor activated downstream of PERK and eIF2 α ER stress responsive pathway) in axons induces axonal damage through a cell-non-autonomous mechanism that propagates between neurons [132]. These data suggest that sustained PERK-eIF2 α -ATF4 activation worsens AD pathogenesis, and that PERK localization in MAMs may act as a new pathogenic route contributing to AD development.

Table 1. MAMs molecular component alterations in AD. These alterations include reduced (↓), increased (↑), unchanged expressions (=), or interaction (↔) between proteins observed in AD study models and human-derived samples (SAD brains and SAD/ FAD fibroblasts); KO: knock-out; KI: knock-in; “OE”: overexpressing; MCI: mild cognitive impairment; GVB: granulovacuolar degeneration bodies; A β : A β oligomers.

Proteins	Alterations	Study Models	References
MFNs	Polymorphism	AD patients	[40]
	↓MFN2 & MFN1 (proteins and mRNA)	AD brains (hippocampus & frontal cortex) & N2a “OE” APP ^{swe}	[41–43]
	↑MFN2	MCI cytoplasmic hybrid (cybrid) cells	[44]
	↑MFN2↔PS2 (FAD), ↑MAMs	MFN2 KO MEFs FAD PS2 (N141I) Mice	[46]
IP ₃ R-Grp75-VDAC	↑VDAC	Tg2576 and J20 mice	[53]
	A β ↔VDAC	APP, APP/PS1, 3xTgAD mice & AD brains	[55]
	pTau↔VDAC	(cortical tissues)	[54]
	↑VDAC, ↑IP ₃ R activity, ↑MAMs	A β -treated hippocampal neurons	[56]
	VDAC dephosphorylation	AD brains	[52]
	↓Grp75 FAD PS1/2↔IP ₃ R	AD brains (temporal and parietal cortex) Sf9 cells	[62]
PACS2-PSS1	↑PACS2, ↑PSS1	APP ^{swe} /LDN mice AD brains cortex	[54]
BAP31-FIS1-DRP1	↑Fis1, ↑Drp1	AD brains (frontal cortex)	[42]
	↑Drp1↔Fis	A β ₄₂ -treated neurons, SAD/FAD fibroblasts, N2a “OE” APP ^{swe} , & 5xTgAD mice	[80]
	pTau↔Drp1	AD brains, APP, APP/PS1 & 3xTgAD mice	[55]
	↓Drp1 mito localization	<i>Drosophila</i> “OE” Tau R406W	[133]
	A β ↔Drp1	AD brains (frontal cortex)	[42]
VAPB-PTPIP51	↓VAPB, ↓PTPIP51	AD brains (subicular with GVB neurons)	[90]
	↓VAPB↔PTPIP51	AD brains (cortex)	[92]
Sig-1R-Grp78	↓Sig-1R	AD brains	[109]
	Sig-1R polymorphism	AD patients	[110,111]
	↑Grp78	Streptozotocin model, APP/PS1 mice & A β ₂₅₋₃₅ -treated rats	[134–136]
	↓Grp78 mRNA =Grp78 expression	AD brains (FAD PS1) 5xFAD mice	[101] [102]
PERK	↑PERK pathway	AD brains	[121–126]
		5xFAD mice	[123]
		APP/PS1, APP(SL)/PS1 KI & rTg4510 mice	[124–127]
		APOE4 mice	[128,129]
IRE1 α	↑↓IRE1 α pathway, ↑↓XBP1s	AD brains & 5xFAD mice	[137]
		A β ₄₂ -treated SH-SY5Y & CHO “OE” APP ^{LDN}	[138]
SIT	↑SIT	AD brains, SHSY-5Y “OE” APP ^{swe} or treated with A β	[139]

2.8. Active Inositol-Requiring Transmembrane Kinase and Endonuclease Alpha: IRE1 α

The UPR IRE1 α branch increases protein folding through the induction of chaperones and enhances the removal of misfolded proteins [98]. Active IRE1 α processes the mRNA encoding X-box-binding protein 1 spliced isoform (XBP1s), a transcription factor that upregulates genes encoding mediators of protein folding, ERAD (ER-associated degradation), organelle biogenesis, and protein quality control [98]. A fraction of IRE1 α is located at MAMs through Sig-1R stabilization responding to mitochondrial ROS [103,140]. A recent study demonstrated that the mitochondrial ubiquitin ligase (MITOL/MARCH5) inhibits ER stress-induced apoptosis through ubiquitylation and degradation of IRE1 α at MAMs [141]. IRE1 α at MAMs can also induce cell death via mitochondrial Ca²⁺ overload [142]. Another study linked IRE1 α to mitochondrial dysfunction and apoptosis through the phosphorylation of ASK1 and JNK [143,144].

The activation of the IRE1 α branch is implicated in AD pathogenesis, mainly through the activation of XBP1s [121,122] (Figure 2 and Table 1). Enhanced or reduced XBP1 mRNA splicing was reported in AD human brains [145]. XBP1s activation occurs upon A β treatment lowering BACE1 protein level [138] and activating Kalirin-7 (Kal7), a protein that controls synaptic plasticity [146]. This suggests that XBP1s acts as a protective mechanism in AD. Accordingly, the overexpression of XBP1s protects against A β toxicity [147] and pathological Tau [148]. In addition, a genomic screen

identified a cluster of AD genes as possible direct targets of XBP1s, including APP, and components of the α -secretase, and proteins involved in APP trafficking and maturation [149]. Finally, in both *Drosophila* and mammalian cell culture models of AD, XBP1 overexpression also down-regulates RyR3 expression, which in turn prevents cytosolic Ca^{2+} overload [147]. These last data corroborate studies demonstrating that pharmacological and genetic approaches reducing RyR-mediated exacerbated ER Ca^{2+} leak provide protective effects and rescue several AD pathogenic paradigms in cellular and mice AD models [64–66].

2.9. The Truncated Variant of the Sarco-Endoplasmic Reticulum Ca^{2+} -ATPase 1: S1T

S1T is among molecular partners at the ER-mitochondria interface regulating inter-organelle Ca^{2+} signaling and cell death [150–152]. We reported the induction of S1T expression under pathological ER stress conditions occurring through the PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP (C/EBP homologous protein) pathway. On the one hand, S1T induction amplifies ER stress response, and on the other hand, it enhances ER Ca^{2+} leak, increases the number of ER-mitochondria contact sites, and inhibits mitochondrial movements. This leads to increased Ca^{2+} transfer to mitochondria, thus activating the mitochondrial apoptotic pathway [152]. Interestingly, we recently reported a molecular interplay between S1T-dependent ER Ca^{2+} leak, UPR, and APP processing, likely contributing to AD pathogenesis [139] (Figure 2 and Table 1). We demonstrated that S1T expression is increased in SAD brains and correlates with A β and ER stress chaperone protein levels (Grp78 and Calreticulin). Increased S1T expression is induced in an A β -dependent manner and enhances in return the production of APP-CTFs and A β through specific increases of BACE1 expression and activity. Interestingly, the induction of S1T expression is also linked to neuroinflammation [139]. Other studies are ongoing to unravel the contribution of S1T-mediated ER Ca^{2+} leak to MAMs dysfunctions, synaptic plasticity alterations, and cognitive deficits in AD.

3. The MAMs Hypothesis in the Pathophysiological Process of Alzheimer's Disease

In this chapter, we focus on the role of main AD players in mitochondrial and ER dysfunctions and their link with MAMs alterations in AD.

3.1. Apolipoprotein E: APOE

APOE is a glycoprotein mostly expressed in astrocytes, microglia, and neurons under stress conditions, and in the choroid plexus in the CNS [153,154]. APOE plays a relevant role in lipid transport, in particular cholesterol and cholesterol esters. This occurs via APOE binding to a low-density protein (LDL) receptor, such as LDLR and LDLR-related protein 1 (LDLR-1) [155]. APOE is essential for brain functions since APOE KO mice present synaptic loss and cognition dysfunction. The rescue of APOE in the periphery can improve learning and memory impairments, but without affecting synaptic loss [156]. APOE is a highly polymorphic gene encoding for three major APOE epsilon (ϵ) isoforms (APOE ϵ 2, APOE ϵ 3, and APOE ϵ 4). As stated above, APOE is a genetic risk factor for LOAD forms [3,4]. The elevated risk of AD correlates with the number of APOE ϵ 4 alleles [157]. While APOE ϵ 2 confers a decreased risk of AD in comparison with the APOE ϵ 3 allele, a single APOE ϵ 4 allele increases the risk of AD four-fold compared to the more common APOE ϵ 3/APOE ϵ 3 genotype [157]. The presence of two APOE ϵ 4/APOE ϵ 4 alleles increases the risk of AD by approximately twelve-fold [158]. APOE polymorphism causes alterations in APOE structure and function that results in a different binding to lipids [157]. Notably, there is a relationship between APOE polymorphism and enhanced A β pathology [159].

Mitochondrial dynamics are differently impacted by APOE isoforms. APOE ϵ 4 knock-in (KI) mice exhibited higher expression of MFN1 and lower expression of DRP1 in the hippocampus in comparison to APOE ϵ 3-expressing mice. The decrease in DRP1 was further confirmed in AD patients carrying two APOE ϵ 4 alleles [160]. The expression of COX1 and translocase of outer mitochondrial membrane 40 homolog (TOMM40) were also higher in APOE ϵ 4-expressing mice, which supports the idea of increased mitochondrial fusion [160]. The APOE ϵ 4 isoform is also associated with altered mitophagy,

characterized by reduced expression of cleaved PINK1 and higher levels of Parkin and SQSTM1/p62 in the hippocampus of APOE ϵ 4-expressing mice. This latter presented elongated mitochondria with a smaller cristae density compared to APOE ϵ 3-expressing mice hippocampus, demonstrating the contribution of APOE ϵ 4 to mitochondrial structure alteration [160]. In addition, a proteomic study showed that N2a cells expressing APOE ϵ 4 had impaired respiration and increased glycolysis in basal conditions and presented less reserve capacity to generate ATP, decreased NAD⁺/NADH ratio, and increased ROS and the mitochondrial Ca²⁺ load under a stress condition in comparison to APOE ϵ 3-expressing cells [161]. Importantly, APOE ϵ 4-expressing cells also manifest increased levels of VDAC1, IP₃R, BAP31, FIS1, and MFN2 and a decrease in Grp75 expression, showing that APOE ϵ 4 modulates several molecular components of MAMs [161]. As shown in Figure 1, one main function of MAMs is phospholipid synthesis, specially phosphatidylserine (PS), which is transported from the ER to mitochondria, where it is decarboxylated and transformed in phosphatidylethanolamine (PE) that is transported to the ER [162]. Human fibroblasts and mice hippocampal neurons subjected to conditioned media (CM) obtained from astrocytes isolated from APOE ϵ 3 and APOE ϵ 4 KI mice showed an increase in PS and PE that was larger with APOE ϵ 4 CM than with APOE ϵ 3 CM [163]. However, this difference was abolished in MFN2 KO MEFs, suggesting that APOE ϵ 4-mediated phospholipids synthesis is strictly dependent on the increased interaction between ER and mitochondria [163]. The same study also reported that APOE ϵ 4 CM enhances cholesterol oleate level compared to APOE ϵ 3 CM and that this effect is abolished in MFN2 KO MEFs. Accordingly, fibroblasts treated with APOE ϵ 4 CM presented increased cholesteryl ester synthesis and lipid droplets as compared to APOE ϵ 3 CM treated fibroblasts [163]. This study was the first to unravel a relevant role of the APOE ϵ 4 allele in controlling MAMs activity, likely contributing to LOAD development.

3.2. Presenilins

Both PS1 and PS2 are localized in the ER, Golgi, and golgian network, the plasma membrane, endosomes, lysosomes, nuclear membrane, and mitochondria [164]. Being catalytic subunits of the γ -secretase complex, PSs are well known to be involved in APP metabolism, leading to the production of different fragments and defining the length of A β peptide. Currently, more than 320 mutations of PS1 and 63 mutations of PS2 have been shown to be involved in AD or other dementias (Alzforum: <https://www.alzforum.org/mutations>). Many of these mutations are responsible for the increased A β ₄₂/A β ₄₀ ratio. Of note, A β ₄₂ peptides are more toxic and prone to aggregation and accumulation in plaques than A β ₄₀ peptides. In addition, PSs participate in several functions closely linked to MAMs. First, it was described that PSs participate in autophagy by favoring the fusion of autophagosomes with lysosomes [164]. Neely et al. reported enhanced autophagosomes and LC3-II levels in fibroblasts isolated from PS1 or PS2 KO mice arguing for a defective lysosomal degradation of the autophagosome [165]. Moreover, Száraz and colleagues suggested that the alteration in autophagy involves Ca²⁺ homeostasis dysregulation associated with ER stress response, particularly to Grp78 enrichment in MAMs [166]. Interestingly, PSs are also involved in ER Ca²⁺ regulation [167], forming a passive ER Ca²⁺ leak channel [168], directly interacting with SERCA2b [169], or directly or indirectly impacting IP₃R- and RyR-mediated ER Ca²⁺ release [68,170]. These data support the idea that FAD PSs dysregulate both ER Ca²⁺ store filling and emptying.

More recently, PS1 and PS2 have been reported to be enriched in MAMs [171], with PS2 being directly involved in the interaction between ER and mitochondria [46,172]. Filadi and colleagues showed that PS2 can directly interact with and requires MFN2 expression to modulate the coupling between ER and mitochondria [46]. The authors also showed that two familial mutants of PS2 (T122R and N141I), known to be involved in Ca²⁺ release during atypical dementia and A β ₄₂ production during AD, are more efficient in ER-mitochondria tethering than wild type (WT) PS2, increasing mitochondrial Ca²⁺ uptake upon ER Ca²⁺ release [46,173]. Furthermore, SH-SY5Y neuroblastoma cells expressing these PS2 mutants and FAD-PS2 patient-derived fibroblasts showed a blockade in the late phase of autophagy [174], as demonstrated by an increase of LC3-II and SQSTM1/p62 levels,

and alteration of the RAB7-dependent autophagosome-lysosome fusion step as a consequence of the alteration of the Ca^{2+} content of intracellular stores and cytosolic Ca^{2+} signaling [174]. These studies demonstrate that the reinforcement of MAMs linked to FAD-PS2 mutants contributes to several mitochondrial dysfunctions reported in AD, in particular the disruption of subcellular Ca^{2+} handling and the regulation of autophagy [46,173,174].

Although FAD PS1 mutants do not seem to be directly involved in the ER-mitochondria tethering, several data show that PS1 FAD mutations alter several functions linked to MAMs. Firstly, several FAD PS1 mutants (M146V, L166P, A246E, E273A, G384A, and P436Q) were shown to exert a dominant-negative effect on ER Ca^{2+} leak and/ or to exacerbate IP_3R - and RyR -mediated ER Ca^{2+} release and alter neuronal Ca^{2+} signaling [67,68,168,170,175]. Moreover, the expression of PS1-E280A FAD mutation in Purkinje cells and SH-SY5Y cells was shown to impair Ca^{2+} homeostasis associated with reduced levels of CACNA1A, $\text{IP}_3\text{R1}$, and $\text{IP}_3\text{R3}$, leading to decreased levels of Ca^{2+} -dependent mitochondrial transport proteins (i.e., MIRO1 and KIF5C), and enhanced tethering of ER and mitochondria [176]. Finally, PS1-FAD fibroblasts (A246E, M233T, H163Y, M146L and L392V) were also described to impact autophagy by impairing autolysosome acidification and cathepsin D activation that are caused by the failure of PS1 to target the v-ATPase V0a1 subunit to lysosomes [177]. Together, these results suggest that PS1 is likely directly or indirectly involved in MAMs structure and functions.

To conclude, these data support the hypothesis that different pathways regulated by PSs converge towards MAMs-linked Ca^{2+} homeostasis, autophagy, and mitochondria function, the alterations of which represent common functional defects in AD.

3.3. APP-Derived C-Terminal Fragments (APP-CTFs) and $\text{A}\beta$

APP participates neuronal migration, neurites outgrowth, synaptogenesis, synapses stabilization, and synaptic plasticity [178]. As stated in the introduction, APP is synthesized in the ER and transits through the Golgi apparatus, where it undergoes several post-translational modifications such as N- and O-glycosylations, sialylations, phosphorylations, and sulfations before arriving at the plasma membrane in its mature form [178]. Several studies suggest that APP is also targeted to mitochondria [179,180] (Figure 3 and Table 2). Importantly, it was demonstrated that full-length APP interacts with the mitochondrial import machinery formed by TOMM40 and TIMM23, inhibiting Cyt c oxidase activity and increasing mitochondrial ROS and dysfunction [181]. This finding was further supported by the presence of APP catabolites (i.e., $\text{A}\beta$, C99, and AICD) in the mitochondria [182–187]. Supporting APP localization and its processing in MAMs, we and others demonstrated the presence of APP-CTFs and $\text{A}\beta$ in MAMs and also of different components of the γ -secretase complex in ER and mitochondria [183,187–190]. Consistently, we also showed in vitro activities of both β - and γ -secretases in MAMs of AD mice brains [187]. It has been proposed that MAMs behave as a detergent-resistant lipid raft-like domain [190], sustaining β - and γ -secretase the activities in MAMs [191–193].

Most importantly, we and others also evidenced an increase of ER and mitochondria contact sites in SH-SY5Y cells overexpressing APP^{swe} [187], in fibroblasts from SAD and FAD individuals, as well as in MEFs isolated from mice simple KO for either PS1 or PS2 or both [190]. Increased ER and mitochondria tethering is consistent with the hypothesis that $\text{A}\beta$ is produced at the interface between ER and mitochondria [194] and its subsequent transport into mitochondria via the translocase of the OMM (TOMM) machinery [194], triggering mitochondria dysfunctions (i.e., enhanced ROS, reduced mitochondrial respiratory chain complex I activity, and interaction with several mitochondrial proteins) [195–198] (Figure 3). In addition, $\text{A}\beta$ was shown to regulate fatty-acid metabolism, another function of MAMs, as revealed by neutral lipids accumulation found in neuroblastoma and CHO cells expressing APP^{swe} or APP^{LDN} mutations [187] and in human-derived SAD and FAD fibroblasts [190]. While the toxicity of $\text{A}\beta$ towards mitochondria is undoubtful, Pera et al. also demonstrated the toxic charge of C99 fragment in MAMs. Indeed, the authors showed in PSs double KO MEFs treated with DAPT (a γ -secretase inhibitor), an accumulation of C99 peptide

triggering MAMs deregulation, as manifested by an upregulation of sphingolipid metabolism translated by a higher ceramide and sphingomyelin synthesis in mitochondrial membranes [186,199]. Interestingly, ceramide has been shown to alter mitochondrial lipid composition, disrupting $\Delta\Psi_m$ and mitochondrial membrane permeability [200]. It was also suggested that mitochondrial ceramide elevation could disrupt the assembly and the activity of mitochondrial respiratory complexes and provoke mitochondrial dysfunctions and apoptosis [186]. Another study confirmed the contribution of C99 to lipid metabolism [201]. Hence, pathogenic accumulation of C99 in the ER induces excessive uptake of extracellular cholesterol, trafficking from the plasma membrane to the ER, resulting in the continuous formation, activation, and turnover of MAMs in AD [201] (Table 2). In a recent study, we demonstrated that APP-CTFs accumulates in mitochondria in cellular AD models (SH-SY5Y cells expressing either APP^{swe}, or C99 fragment) as well as in brains of 3xTg-AD mice treated with γ -secretase inhibitor, and in C99-expressing mice [202]. We also demonstrated that APP-CTFs, independently from A β , triggers excessive mitochondrial cristae disorganization, enhances mitochondrial ROS production, and elicits basal mitophagy failure associated with deficient fusion of mitochondria with lysosomes. Importantly, we reported a correlation between APP-CTFs accumulation in mitochondria and the mitophagy failure molecular signature in human post-mortem SAD brains [202] (Table 2).

Taken together, these results led us to assume that APP-CTFs (particularly C99) is directly generated in MAMs, or targeted through an unknown mechanism to MAMs after being produced in endosomes. The overaccumulation of APP-CTFs in MAMs consequently triggers mitochondrial and lipid dysfunctions, and a mitophagy failure phenotype contributing to neuronal demise in AD.

3.4. Tau

Tau is an associated-microtubule protein contributing to axonal transport and synaptic plasticity [203]. Tau is involved in tauopathies such as FTD, fronto-temporal lobar degeneration with Pick bodies, corticobasal degeneration, and AD [204]. During the pathophysiological process of AD, Tau is abnormally hyperphosphorylated and loses its affinity for microtubules. pTau is then redistributed in the somato-dendritic compartment, where it aggregates in insoluble filaments forming NFTs and leading to neuronal dysfunctions through axonal transport alteration [203,205].

Even if there is no description of FAD linked to Tau mutations, “artificial” Tau mutations are used in fundamental research to yield Tau hyperphosphorylation and to mimic, at least in part, some aspects of AD-related Tau pathology. Interestingly, P301L mutation of Tau (Tau P301L), which is known to cause Tau hyperphosphorylation, was reported to decrease mitochondrial complex V levels, leading to impaired mitochondrial respiration and ATP synthesis as well as increased ROS production [206]. The same mutation in the N2a cell line was also shown to interact with Parkin and sequester it in the cytosol, triggering impaired mitophagy [207]. Besides, Tau overexpression in HEK293 cells and rat primary hippocampal neurons enhances the fusion of mitochondria by increasing the expression of fusion proteins OPA1, MFN1, and MFN2 triggering an alteration of mitochondrial dynamics and functions illustrated by decreased ATP level, ATP/ADP ratio, and complex I activity [208]. Perrault et al., revealed that Tau P301L increases the number of ER and mitochondria contacts in the spinal cord motor neurons. They also notice enhanced colocalization of Tau P301L with ER membranes in this model and also in AD brains [209], likely increasing ER-mitochondria tethering. In another study, Tau overexpression in CHO or N2a cells was reported to alter the distribution of mitochondria and ER to the cell periphery [210]. Afreen et al. then reported that calpain-mediated cleavage of Tau generating Tau₄₅₋₂₃₀ fragment (occurring downstream of increased Ca²⁺ influx after exposure of hippocampal neurons to A β) is associated with the cytoskeleton plus membrane-bound organelles and reduces the number of mitochondria transported along hippocampal axons [211].

Together, these data suggest that the hyperphosphorylation and elevated intraneuronal concentration of Tau would affect the transport of mitochondria or ER dynamics, thus impairing the formation of ER and mitochondria contact sites in AD.

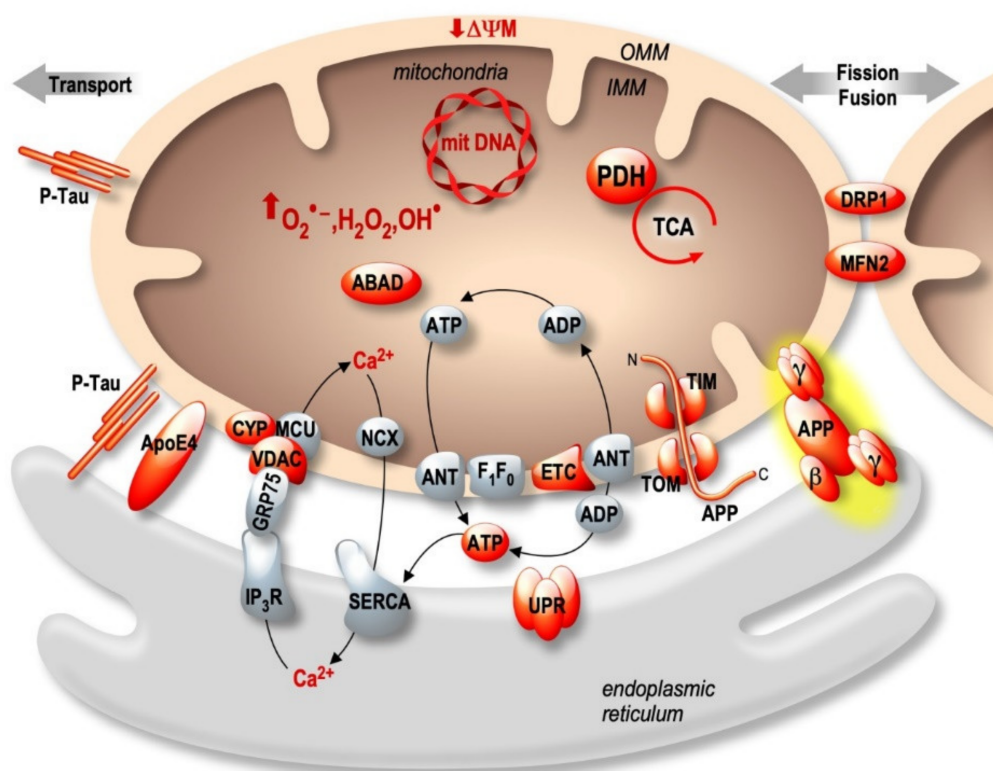


Figure 3. APP and its derived fragments APP-CTFs and Aβ; presenilins (PSs), pTau and APOE4 are involved in the impairment of the expression and activity of several mitochondrial proteins (highlighted in red) and interfere with UPR in the ER. APP localizes and is processed by β- and γ-secretases in MAMs. AD Molecular partners also disturb MAMs structure and function.

Table 2. Alterations of mitochondria- and MAMs-structure and functions associated with AD-related proteins. These alterations include: ↓ reduced or ↑ increased expression/activity, ↔ interaction observed in AD study models (cells and mice brains) and human derived samples (SAD brains and SAD/FAD fibroblasts). Mito: mitochondria, KO: knock-out; PSDKO: PS1 and PS2 double KO; KI: knock-in; “SI”: silencing; “OE”: overexpressing; PS: phosphatidylserine; CO: cholesterol oleate; CE: cholesterol ester; CM: conditioned media, WT: wild type; CGC: cerebellar granule cells; ROS: reactive oxygen species.

Proteins	Alterations	Study Models	Ref
APOEε4	↓DRP1, ↑MFN1	AD brains	[160]
	Mito fusion (↑COX1, ↑TOMM40)	APOEε4 KI mice	
	Mitophagy failure (↓PINK1, ↑Parkin, ↑p62) ↑VDAC1, ↑IP3R, ↑BAP31, ↑Fis1, ↑MFN2, ↓Grp75 ↑PS, ↑CO, ↑CE, ↑Lipid droplets	N2acells “OE” APOE4 APOE4 KI mice astrocytes CM treatment	[161] [163]
PS1 & PS2	↑LC3-II and ↑autophagosomes	MEFs (PS1KO, PS2KO, & PSDKO) HepG2 cells (PS1“SI”)	[165,166]
	PS2↔Mfn2 ↑MAMs	MEFs (MFN2 KO), Human FAD fibroblasts, SHSY-5Y & primary neurons “OE” MFN2	[46,172]
	↑ER-mitochondria coupling Autophagy blockade (↑LC3-II, ↑p62)	FAD PS2 (T122R, N141I) & SHSY-5Y “OE” FAD PS2	[174]
	↓IP3R1/3, ↓MIRO1, ↓KIF5C ↑MAMs	Purkinje & SHSY-5Y “OE” FAD PS1(E280A)	[176]
	Autophagy impairment	FAD PS1 (A246E, M233T, H163Y, M146L, L392V) fibroblasts	[177]
	↑MAMs	PS1 KO, PS2 KO, PSDKO	[190]
	↑ MAMs function (↑CE, ↑PS, ↑PE, ↑lipid droplets)	FAD and SAD patient fibroblasts	

Table 2. Cont.

Proteins	Alterations	Study Models	Ref
APP, A β & APP-CTFs	APP in mitochondria	HCN-1A, COS cells "OE" APPWT or APP chimeric mutants & APP ^{swe} mice	[169,180,181]
	APP, APP-CTFs, A β in MAMs ↑MAMs	SHSY-5Y "OE" APP ^{swe} , APP ^{LDN}	[185–187,190,194]
	↑ceramide, ↓sphingomyelin, ↑lipid droplets (A β dependant)	Mice brains (WT, APP23 & APP23/PS45) PSDKO +/- DAPT	
	↑mito ROS, ↓complex I & IV activities (A β -dependant)	AD brains; A β -treated CGCs	[195,196]
↑mito ROS, ↓complex I activity Mitophagy failure (APP-CTFs dependant)	3xTgAD, 2xTgAD, AAV-C99 mice, SHSY-5Y cells "OE" APP ^{swe} or C99 +/- γ -secretase inhibitor AD brains	[202]	
Tau	↓complex V, ↓ATP, ↑mitROS	Tau _{P301L} mice	[206]
	Mitophagy failure (↓Parkin mitochondrial translocation)	N2a "OE" Tau _{P301L}	[207]
	↑OPA1, ↑MFN1/2, Mitochondrial fragmentation, ↓complex I activity, ↓ATP	HEK293 & rat primary hippocampal neurons "OE" Tau	[208]
	Mitochondria & ER distributions	CHO and N2a cells "OE" Tau	[210]
	↓Mito axonal movement	Hippocampal neurons "OE" Tau45-230	[211]
	↑MAMs	Motor neurons "OE" Tau _{P301L}	[209]
↓MAMs	Tau _{P301L} mice	[212]	

4. MAMs as a Potential Therapeutic Strategy

The studies highlighted above tend to demonstrate that MAMs structure and function alterations could play a role during the pathophysiological process of AD. Taking this into account, we may assume that MAMs should constitute a new therapeutic target in AD. Up to now, different assays were driven to target either ER or mitochondrial dysfunctions in neurodegenerative diseases, as an indirect way to alleviate MAMs-associated dysfunctions. Among them, Salubrinal, a selective inhibitor eIF2 α phosphatase enzymes, prevents ceramide-induced apoptotic cell death through the inhibition of IRE1 α /apoptosis signal regulating kinase 1 (ASK1)/c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphorylation [213] and decreases apoptosis in neurons and microglia exposed to A β [214,215]. Salubrinal also maintains eIF2 α phosphorylated, thus inhibiting the synthesis of ER secretory proteins and decreasing proteoglycans and other profibrotic proteins, then facilitating axonal regeneration [216]. Celastrol and Tanespimycin, which target the heat shock protein response, are other potential drugs showing promising results in transgenic mouse models of AD by preventing NF κ B activation, inhibiting BACE1 expression and reducing A β ₄₀, A β ₄₂ levels as well as C99 and sAPP β production and NFTs [217,218].

Among mitochondrial targets, mitochondrial division inhibitor-1 (mdivi-1), a selective inhibitor of mitochondrial fission through the targeting of DRP1, has been reported to display neuroprotective properties by rescuing propofol-induced toxicity in stem cell-derived neurons [219]. In microglial cells, inhibition of mitochondrial fission by mdivi-1 significantly reduced A β -induced expression of CD11b (a pan-macrophage marker) and reversed cell death. Importantly, mdivi-1 treatment also markedly reversed mitochondrial dysfunction (loss of $\Delta\Psi$ m and Cyt c release) and caspase-3 activation) [220]. These results were further confirmed in neuroblastoma N2a cells subjected to A β ₄₂ treatment, showing that mdivi-1 enhanced mitochondrial fusion activity, lowered fission machinery, and increased biogenesis and synaptic proteins. These features were associated with elevated cell viability in cells exposed to A β and treated with mdivi-1 [221]. The same group reported synergistic protective effects of a mitochondria-targeted antioxidant SS31 and mdivi-1 in N2a cells expressing APP^{swe}/LDN mutations by increasing mitochondrial DNA copy number and cell survival, reducing mitochondrial dysfunctions. Altogether, these data suggest that mdivi-1 exerts neuroprotective effects against A β -induced mitochondrial structure and function alterations and apoptosis [222]. Another mitochondrial fission inhibitor, P110, abrogating the interaction between DRP1 and FIS1, was shown to inhibit excessive fission as well as to restore mitochondrial function [223]; however, its therapeutic potential is still not demonstrated in the context of AD.

Few studies pointed to MAMs as a potential therapeutic target. Arismendi-Morillo et al. showed that restriction of glucose or ketogenesis influences the structure and function of MAMs

and could be used as a therapeutic approach in astrocytic tumors [224]. Lynes et al. also found that palmitoylation of cysteine residues could assemble ER membrane proteins in MAMs [225]. The use of artificial linkers to control the connections between ER and mitochondria was also proposed. The expression of an ER-mitochondria linker in a *Drosophila* model of AD increases physical coupling between both organelles, raises Ca^{2+} levels in mitochondria known to be detrimental to their function. Indeed, authors also noticed an increase of ROS production in flies expressing the linker. However, while the expression of ER-mitochondria linker in flies reverses electron transport and extends *Drosophila* lifespan, authors report negative outcomes in mice [226]. Rapamycin-inducible artificial linkers with different lengths [227] allow to demonstrate that distinct processes may require an optimal spatial ER-mitochondria distance. Indeed, while a loose connection is needed for Ca^{2+} delivery, tighter connections are required for lipid and protein transfer between organelles [227]. A recent study proposed urolithin A (produced in the gut microbiome) as a pharmacological tool to control ER-mitochondria contacts and Ca^{2+} homeostasis in AD [228]. Urolithin A lowered mitochondrial Ca^{2+} influx and significantly alleviated high glucose-induced mitochondrial ROS accumulation. Most importantly urolithin A reduces the expression of APP, BACE1, as well as $\text{A}\beta$ production and Tau phosphorylation [228].

5. Conclusions

A large number of studies delineated the proteome composition of MAMs and deciphered the molecular and functional links between MAMs dysfunctions and AD, where disturbances of mitochondrial and ER Ca^{2+} signaling were consistently reported. Besides Ca^{2+} tunneling and apoptosis, MAMs are also the hub for autophagosome and mitophagosome membranes biosynthesis and lipid biosynthesis that are all cellular hallmarks that were reported to be perturbed in AD study models and most importantly in human AD-derived samples. About 30 million individuals are estimated to be affected by AD worldwide and to date, no effective treatment exists to arrest disease progression. This review highlights the relevance of MAMs dysfunctions in AD development and pinpoints the possibility to target MAMs molecular components as therapeutical targets to treat or alleviate or slow down AD pathogenesis.

Author Contributions: Writing—original draft preparation F.E., P.F.K., A.M., L.V.-B. Writing—review and editing, F.E., P.F.K., and M.C. Editing, M.C., and F.C. Supervision, M.C. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This work has been developed and supported through the LABEX (excellence laboratory, program investment for the future) DISTALZ (Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease) to FC, and by Fondation Vaincre Alzheimer to MC and by São Paulo Research Foundation (FAPESP, Grant #2019/26084-2) to P.F.K.

Acknowledgments: We thank Franck Aguila for figures drawing.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Checler, F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* **1995**, *65*, 1431–1444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Nhan, H.S.; Chiang, K.; Koo, E.H. The multifaceted nature of amyloid precursor protein and its proteolytic fragments: Friends and foes. *Acta Neuropathol.* **2015**, *129*, 1–19. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Corder, E.H.; Saunders, A.M.; Strittmatter, W.J.; Schmechel, D.E.; Gaskell, P.C.; Small, G.W.; Roses, A.D.; Haines, J.L.; Pericak-Vance, M.A. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* **1993**, *261*, 921–923. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lambert, J.C.; Ibrahim-Verbaas, C.A.; Harold, D.; Naj, A.C.; Sims, R.; Bellenguez, C.; DeStafano, A.L.; Bis, J.C.; Beecham, G.W.; Grenier-Boley, B.; et al. Meta-Analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat. Genet.* **2013**, *45*, 1452–1458. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

5. Kunkle, B.W.; Grenier-Boley, B.; Sims, R.; Bis, J.C.; Damotte, V.; Naj, A.C.; Boland, A.; Vronskaya, M.; van der Lee, S.J.; Amlie-Wolf, A.; et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A β , tau, immunity and lipid processing. *Nat. Genet.* **2019**, *51*, 414–430. [[CrossRef](#)]
6. Bellenguez, C.; Grenier-Boley, B.; Lambert, J.C. Genetics of Alzheimer's disease: Where we are, and where we are going. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2020**, *61*, 40–48. [[CrossRef](#)]
7. Tanzi, R.E.; Bertram, L. Twenty years of the Alzheimer's disease amyloid hypothesis: A genetic perspective. *Cell* **2005**, *120*, 545–555. [[CrossRef](#)]
8. Van Cauwenbergh, C.; Van Broeckhoven, C.; Sleegers, K. The genetic landscape of Alzheimer disease: Clinical implications and perspectives. *Genet. Med.* **2016**, *18*, 421–430. [[CrossRef](#)]
9. Hardy, J.A.; Higgins, G.A. Alzheimer's disease: The amyloid cascade hypothesis. *Science* **1992**, *256*, 184–185. [[CrossRef](#)]
10. Panza, F.; Lozupone, M.; Logroscino, G.; Imbimbo, B.P. A critical appraisal of amyloid- β -targeting therapies for Alzheimer disease. *Nat. Rev. Neurol.* **2019**, *15*, 73–88. [[CrossRef](#)]
11. Flammang, B.; Pardossi-Piquard, R.; Sevalle, J.; Debayle, D.; Dabert-Gay, A.S.; Thévenet, A.; Lauritzen, I.; Checler, F. Evidence that the amyloid- β protein precursor intracellular domain, AICD, derives from β -secretase-generated C-terminal fragment. *J. Alzheimer's Dis.* **2012**, *30*, 145–153. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Willem, M.; Tahirovic, S.; Busche, M.A.; Ovsepian, S.V.; Chafai, M.; Kootar, S.; Hornburg, D.; Evans, L.D.B.; Moore, S.; Daria, A.; et al. n-Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* **2015**, *526*, 443–447. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Zhang, Z.; Song, M.; Liu, X.; Su Kang, S.; Duong, D.M.; Seyfried, N.T.; Cao, X.; Cheng, L.; Sun, Y.E.; Ping Yu, S.; et al. Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat. Commun.* **2015**, *6*, 1–16. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Baranger, K.; Marchalant, Y.; Bonnet, A.E.; Crouzin, N.; Carrete, A.; Paumier, J.M.; Py, N.A.; Bernard, A.; Bauer, C.; Charrat, E.; et al. MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73*, 217–236. [[CrossRef](#)]
15. Bourgeois, A.; Lauritzen, I.; Lorivel, T.; Bauer, C.; Checler, F.; Pardossi-Piquard, R. Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3 \times TgAD and 2 \times TgAD mice. *Neurobiol. Aging* **2018**, *71*, 21–31. [[CrossRef](#)]
16. Lauritzen, I.; Pardossi-Piquard, R.; Bauer, C.; Brigham, E.; Abraham, J.D.; Ranaldi, S.; Fraser, P.; St-George-Hyslop, P.; Le Thuc, O.; Espin, V.; et al. The β -secretase-derived C-terminal fragment of β APP, C99, but not A β , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 16243–16255. [[CrossRef](#)]
17. Lauritzen, I.; Pardossi-Piquard, R.; Bourgeois, A.; Pagnotta, S.; Biferi, M.G.; Barkats, M.; Lacor, P.; Klein, W.; Bauer, C.; Checler, F. Intraneuronal aggregation of the β -CTF fragment of APP (C99) induces A β -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 257–276. [[CrossRef](#)]
18. Kwart, D.; Gregg, A.; Scheckel, C.; Murphy, E.A.; Paquet, D.; Duffield, M.; Fak, J.; Olsen, O.; Darnell, R.B.; Tessier-Lavigne, M. Erratum: A large panel of isogenic APP and PSEN1 mutant human iPSC neurons reveals shared endosomal abnormalities mediated by APP β -CTFs, not A β . *Neuron* **2019**, *104*, 256–270. [[CrossRef](#)]
19. Berridge, M.J. The endoplasmic reticulum: A multifunctional signaling organelle. *Cell Calcium* **2002**, *32*, 235–249. [[CrossRef](#)]
20. Osellame, L.D.; Blacker, T.S.; Duchon, M.R. Cellular and molecular mechanisms of mitochondrial function. *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *26*, 711–723. [[CrossRef](#)]
21. Giacomello, M.; Pellegrini, L. The coming of age of the mitochondria—ER contact: A matter of thickness. *Cell Death Differ.* **2016**, *23*, 1417–1427. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Rizzuto, R.; Pinton, P.; Carrington, W.; Fay, F.S.; Fogarty, K.E.; Lifshitz, L.M.; Tuft, R.A.; Pozzan, T. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* **1998**, *280*, 1763–1766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Csordás, G.; Renken, C.; Várnai, P.; Walter, L.; Weaver, D.; Buttle, K.F.; Balla, T.; Mannella, C.A.; Hajnóczky, G. Structural and functional features and significance of the physical linkage between ER and mitochondria. *J. Cell Biol.* **2006**, *174*, 915–921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Walter, L.; Hajnóczky, G. Mitochondria and endoplasmic reticulum: The lethal interorganelle cross-talk. *J. Bioenerg. Biomembr.* **2005**, *37*, 191–206. [[CrossRef](#)]

25. Veeresh, P.; Kaur, H.; Sarmah, D.; Mounica, L.; Verma, G.; Kotian, V.; Kesharwani, R.; Kalia, K.; Borah, A.; Wang, X.; et al. Endoplasmic reticulum–mitochondria crosstalk: From junction to function across neurological disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2019**, *1457*, 41–60. [[CrossRef](#)]
26. Van Vliet, A.R.; Agostinis, P. Mitochondria-Associated membranes and ER stress. In *Current Topics in Microbiology and Immunology*; Springer Nature Switzerland AG: Cham, Switzerland, 2018; Volume 414, pp. 73–102.
27. Gerakis, Y.; Hetz, C. Emerging roles of ER stress in the etiology and pathogenesis of Alzheimer’s disease. *FEBS J.* **2018**, *285*, 995–1011. [[CrossRef](#)]
28. Hashimoto, S.; Saido, T.C. Critical review: Involvement of endoplasmic reticulum stress in the aetiology of Alzheimer’s disease. *Open Biol.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)]
29. Esteras, N.; Abramov, A.Y. Mitochondrial calcium deregulation in the mechanism of beta-amyloid and tau pathology. *Cells* **2020**, *9*, 2135. [[CrossRef](#)]
30. Wang, W.; Zhao, F.; Ma, X.; Perry, G.; Zhu, X. Mitochondria dysfunction in the pathogenesis of Alzheimer’s disease: Recent advances. *Mol. Neurodegener.* **2020**, *15*, 1–22. [[CrossRef](#)]
31. Chen, H.; Chomyn, A.; Chan, D.C. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 26185–26192. [[CrossRef](#)]
32. Cipolat, S.; De Brito, O.M.; Dal Zilio, B.; Scorrano, L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2004**, *101*, 15927–15932. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Pich, S.; Bach, D.; Briones, P.; Liesa, M.; Camps, M.; Testar, X.; Palacín, M.; Zorzano, A. The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum. Mol. Genet.* **2005**, *14*, 1405–1415. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Youle, R.J.; Karbowski, M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2005**, *6*, 657–663. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Martorell-Riera, A.; Segarra-Mondejar, M.; Muñoz, J.P.; Ginet, V.; Olloquequi, J.; Pérez-Clausell, J.; Palacín, M.; Reina, M.; Puyal, J.; Zorzano, A.; et al. Mfn2 downregulation in excitotoxicity causes mitochondrial dysfunction and delayed neuronal death. *EMBO J.* **2014**, *33*, 2388–2407. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Tanaka, A.; Cleland, M.M.; Xu, S.; Narendra, D.P.; Suen, D.F.; Karbowski, M.; Youle, R.J. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell Biol.* **2010**, *191*, 1367–1380. [[CrossRef](#)]
37. Naon, D.; Zaninello, M.; Giacomello, M.; Varanita, T.; Grespi, F.; Lakshminarayanan, S.; Serafini, A.; Semenzato, M.; Herkenne, S.; Hernández-Alvarez, M.I.; et al. Critical reappraisal confirms that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 11249–11254. [[CrossRef](#)]
38. Chen, H.; McCaffery, J.M.; Chan, D.C. Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* **2007**, *130*, 548–562. [[CrossRef](#)]
39. Zhang, L.; Trushin, S.; Christensen, T.A.; Bachmeier, B.V.; Gateno, B.; Schroeder, A.; Yao, J.; Itoh, K.; Sesaki, H.; Poon, W.W.; et al. Altered brain energetics induces mitochondrial fission arrest in Alzheimer’s Disease. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–12. [[CrossRef](#)]
40. Kim, Y.J.; Park, J.K.; Kang, W.S.; Kim, S.K.; Han, C.; Na, H.R.; Park, H.J.; Kim, J.W.; Kim, Y.Y.; Park, M.H.; et al. Association between mitofusin 2 gene polymorphisms and late-onset Alzheimer’s disease in the Korean population. *Psychiatry Investig.* **2017**, *14*, 81–85. [[CrossRef](#)]
41. Wang, X.; Su, B.; Lee, H.G.; Li, X.; Perry, G.; Smith, M.A.; Zhu, X. Impaired balance of mitochondrial fission and fusion in Alzheimer’s disease. *J. Neurosci.* **2009**, *29*, 9090–9103. [[CrossRef](#)]
42. Manczak, M.; Calkins, M.J.; Reddy, P.H. Impaired mitochondrial dynamics and abnormal interaction of amyloid beta with mitochondrial protein Drp1 in neurons from patients with Alzheimer’s disease: Implications for neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 2495–2509. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Park, J.; Choi, H.; Min, J.S.; Kim, B.; Lee, S.R.; Yun, J.W.; Choi, M.S.; Chang, K.T.; Lee, D.S. Loss of mitofusin 2 links beta-amyloid-mediated mitochondrial fragmentation and Cdk5-induced oxidative stress in neuron cells. *J. Neurochem.* **2015**, *132*, 687–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Gan, X.; Wu, L.; Huang, S.; Zhong, C.; Li, G.; Yu, H.; Swerdlow, R.H.; Chen, J.X.; Yan, S.S. Oxidative stress-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase contributes to mild cognitive impairment-related mitochondrial dysfunction. *Free Radic. Biol. Med.* **2014**, *75*, 230–240. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

45. Leal, N.S.; Schreiner, B.; Pinho, C.M.; Filadi, R.; Wiehager, B.; Karlström, H.; Pizzo, P.; Ankarcrona, M. Mitofusin-2 knockdown increases ER-mitochondria contact and decreases amyloid β -peptide production. *J. Cell. Mol. Med.* **2016**, *20*, 1686–1695. [[CrossRef](#)]
46. Filadi, R.; Greotti, E.; Turacchio, G.; Luini, A.; Pozzan, T.; Pizzo, P. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum-mitochondria coupling by tuning the antagonistic effect of mitofusin 2. *Cell Rep.* **2016**, *15*, 2226–2238. [[CrossRef](#)]
47. Berridge, M.J. Inositol triphosphate and calcium signalling. *Nature* **1993**, *361*, 315–325. [[CrossRef](#)]
48. Joseph, S.K.; Hajnóczky, G. IP3 receptors in cell survival and apoptosis: Ca²⁺ release and beyond. *Apoptosis* **2007**, *12*, 951–968. [[CrossRef](#)]
49. Mikoshiba, K. IP3 receptor/Ca²⁺ channel: From discovery to new signaling concepts. *J. Neurochem.* **2007**, *102*, 1426–1446. [[CrossRef](#)]
50. De Stefani, D.; Raffaello, A.; Teardo, E.; Szabò, I.; Rizzuto, R. A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **2011**, *476*, 336–340. [[CrossRef](#)]
51. Szabadkai, G.; Bianchi, K.; Várnai, P.; De Stefani, D.; Wieckowski, M.R.; Cavagna, D.; Nagy, A.I.; Balla, T.; Rizzuto, R. Chaperone-Mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* **2006**, *175*, 901–911. [[CrossRef](#)]
52. Yoo, B.C.; Kim, S.H.; Cairns, N.; Fountoulakis, M.; Lubec, G. Deranged expression of molecular chaperones in brains of patients with Alzheimer's disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *280*, 249–258. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Cuadrado-Tejedor, M.; Vilariño, M.; Cabodevilla, F.; Del Río, J.; Frechilla, D.; Pérez-Mediavilla, A. Enhanced expression of the voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) in Alzheimer's disease transgenic mice: An insight into the pathogenic effects of amyloid- β . *J. Alzheimers Dis.* **2011**, *23*, 195–206. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Hedskog, L.; Pinho, C.M.; Filadi, R.; Rönnbäck, A.; Hertwig, L.; Wiehager, B.; Larssen, P.; Gellhaar, S.; Sandebring, A.; Westerlund, M.; et al. Modulation of the endoplasmic reticulum-mitochondria interface in Alzheimer's disease and related models. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 7916–7921. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Manczak, M.; Reddy, P.H. Abnormal interaction of VDAC1 with amyloid beta and phosphorylated tau causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 5131–5146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Fernandez-Echevarria, C.; Díaz, M.; Ferrer, I.; Canerina-Amaro, A.; Marin, R. A β promotes VDAC1 channel dephosphorylation in neuronal lipid rafts. Relevance to the mechanisms of neurotoxicity in Alzheimer's disease. *Neuroscience* **2014**, *278*, 354–366. [[CrossRef](#)]
57. Manczak, M.; Sheiko, T.; Craigen, W.J.; Reddy, P.H. Reduced VDAC1 protects against Alzheimer's disease, mitochondria, and synaptic deficiencies. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *37*, 679–690. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Ito, E.; Oka, K.; Etcheberrigaray, R.; Nelson, T.J.; McPhie, D.L.; Tofel-Grehl, B.; Gibson, G.E.; Alkon, D.L. Internal Ca²⁺ mobilization is altered in fibroblasts from patients with Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1994**, *91*, 534–538. [[CrossRef](#)]
59. Cheung, K.; Mei, L.; Mak, D.D.; Hayashi, I.; Iwatsubo, T.; Kang, D.E.; Foskett, J.K. Gain-of-function enhancement of InsP3 receptor modal gating by familial Alzheimer's disease-linked presenilin mutants in human cells and mouse neurons. *Sci. Signal.* **2010**, *3*. [[CrossRef](#)]
60. Demuro, A.; Parker, I. Cytotoxicity of intracellular A β 42 amyloid oligomers involves Ca²⁺ release from the endoplasmic reticulum by stimulated production of inositol trisphosphate. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 3824–3833. [[CrossRef](#)]
61. Shilling, D.; Müller, M.; Takano, H.; Mak, D.O.D.; Abel, T.; Coulter, D.A.; Foskett, J.K. Suppression of InsP3 receptor-mediated Ca²⁺ signaling alleviates mutant presenilin-linked familial Alzheimer's disease pathogenesis. *J. Neurosci.* **2014**, *34*, 6910–6923. [[CrossRef](#)]
62. Cheung, K.H.; Shineman, D.; Müller, M.; Cárdenas, C.; Mei, L.; Yang, J.; Tomita, T.; Iwatsubo, T.; Lee, V.M.Y.; Foskett, J.K. Mechanism of Ca²⁺ disruption in Alzheimer's disease by presenilin regulation of InsP3 receptor channel gating. *Neuron* **2008**, *58*, 871–883. [[CrossRef](#)]
63. Del Prete, D.; Checler, F.; Chami, M. Ryanodine receptors: Physiological function and deregulation in Alzheimer disease. *Mol. Neurodegener.* **2014**, *9*, 21. [[CrossRef](#)]

64. Lacampagne, A.; Liu, X.; Reiken, S.; Bussiere, R.; Meli, A.C.; Lauritzen, I.; Teich, A.F.; Zalk, R.; Saint, N.; Arancio, O.; et al. Post-Translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits. *Acta Neuropathol.* **2017**, *134*, 749–767. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Bussiere, R.; Lacampagne, A.; Reiken, S.; Liu, X.; Scheuerman, V.; Zalk, R.; Martin, C.; Checler, F.; Marks, A.R.; Chami, M. Amyloid beta production is regulated by beta2-adrenergic signaling-mediated post-translational modifications of the ryanodine receptor. *J. Biol. Chem.* **2017**, *292*, 10153–10168. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Oules, B.; Del Prete, D.; Greco, B.; Zhang, X.; Lauritzen, I.; Sevalle, J.; Moreno, S.; Paterlini-Brechot, P.; Trebak, M.; Checler, F.; et al. Ryanodine receptor blockade reduces amyloid-beta load and memory impairments in Tg2576 mouse model of Alzheimer disease. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 11820–11834. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Stutzmann, G.E.; Smith, I.; Caccamo, A.; Oddo, S.; LaFerla, F.M.; Parker, I. Enhanced ryanodine receptor recruitment contributes to Ca²⁺ disruptions in young, adult, and aged Alzheimer's disease mice. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 5180–5189. [[CrossRef](#)]
68. Stutzmann, G.E.; Smith, I.; Caccamo, A.; Oddo, S.; Parker, I.; Laferla, F. Enhanced ryanodine-mediated calcium release in mutant PS1-expressing Alzheimer's mouse models. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2007**, *1097*, 265–277. [[CrossRef](#)]
69. Li, C.; Li, L.; Yang, M.; Zeng, L.; Sun, L. PACS-2: A key regulator of mitochondria-associated membranes (MAMs). *Pharmacol. Res.* **2020**, *160*, 105080. [[CrossRef](#)]
70. Werneburg, N.W.; Bronk, S.F.; Guicciardi, M.E.; Thomas, L.; Dikeakos, J.D.; Thomas, G.; Gores, G.J. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) protein-induced lysosomal translocation of proapoptotic effectors is mediated by phosphofurin acidic cluster sorting protein-2 (PACS-2). *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24427–24437. [[CrossRef](#)]
71. Simmen, T.; Aslan, J.E.; Blagoveshchenskaya, A.D.; Thomas, L.; Wan, L.; Xiang, Y.; Feliciangeli, S.F.; Hung, C.-H.; Crump, C.M.; Thomas, G. PACS-2 controls endoplasmic reticulum-mitochondria communication and Bid-mediated apoptosis. *EMBO J.* **2005**, *24*, 717–729. [[CrossRef](#)]
72. Youker, R.T.; Shinde, U.; Day, R.; Thomas, G. At the crossroads of homeostasis and disease: Roles of the PACS proteins in membrane traffic and apoptosis. *Biochem. J.* **2009**, *421*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Stone, S.J.; Vance, J.E. Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 34534–34540. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Iwasawa, R.; Mahul-Mellier, A.-L.; Datler, C.; Pazarentzos, E.; Grimm, S. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *EMBO J.* **2011**, *30*, 556–568. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
75. Pagliuso, A.; Cossart, P.; Stavru, F. The ever-growing complexity of the mitochondrial fission machinery. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 355–374. [[CrossRef](#)]
76. Shen, Q.; Yamano, K.; Head, B.P.; Kawajiri, S.; Cheung, J.T.M.; Wang, C.; Cho, J.-H.; Hattori, N.; Youle, R.J.; van der Blik, A.M. Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. *Mol. Biol. Cell* **2014**, *25*, 145–159. [[CrossRef](#)]
77. Yu, R.; Jin, S.; Lendahl, U.; Nistér, M.; Zhao, J. Human Fis1 regulates mitochondrial dynamics through inhibition of the fusion machinery. *EMBO J.* **2019**, *38*. [[CrossRef](#)]
78. Rojansky, R.; Cha, M.-Y.; Chan, D.C. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife* **2016**, *5*. [[CrossRef](#)]
79. Namba, T. BAP31 regulates mitochondrial function via interaction with Tom40 within ER-mitochondria contact sites. *Sci. Adv.* **2019**, *5*. [[CrossRef](#)]
80. Joshi, A.U.; Saw, N.L.; Shamloo, M.; Mochly-Rosen, D. Drp1/Fis1 interaction mediates mitochondrial dysfunction, bioenergetic failure and cognitive decline in Alzheimer's disease. *Oncotarget* **2017**, *9*, 6128–6143. [[CrossRef](#)]
81. Wang, T.; Chen, J.; Hou, Y.; Yu, Y.; Wang, B. BAP31 deficiency contributes to the formation of amyloid- β plaques in Alzheimer's disease by reducing the stability of RTN3. *FASEB J.* **2019**, *33*, 4936–4946. [[CrossRef](#)]
82. Manczak, M.; Reddy, P.H. Abnormal interaction between the mitochondrial fission protein Drp1 and hyperphosphorylated tau in Alzheimer's disease neurons: Implications for mitochondrial dysfunction and neuronal damage. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 2538–2547. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

83. Cho, D.-H.; Nakamura, T.; Fang, J.; Cieplak, P.; Godzik, A.; Gu, Z.; Lipton, S.A. S-Nitrosylation of Drp1 Mediates β -Amyloid-Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science* **2009**, *324*, 102–105. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. De Vos, K.J.; Mórutz, G.M.; Stoica, R.; Tudor, E.L.; Lau, K.-F.; Ackerley, S.; Warley, A.; Shaw, C.E.; Miller, C.C.J. VAPB interacts with the mitochondrial protein PTPIP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum. Mol. Genet.* **2012**, *21*, 1299–1311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Stoica, R.; Paillusson, S.; Gomez-Suaga, P.; Mitchell, J.C.; Lau, D.H.W.; Gray, E.H.; Sancho, R.M.; Vizcay-Barrena, G.; De Vos, K.J.; Shaw, C.E.; et al. ALS/FTD-associated FUS activates GSK-3 β to disrupt the VAPB–PTPIP51 interaction and ER–mitochondria associations. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 1326–1342. [[CrossRef](#)]
86. Gomez-Suaga, P.; Paillusson, S.; Stoica, R.; Noble, W.; Hanger, D.P.; Miller, C.C.J. The ER-Mitochondria tethering complex VAPB-PTPIP51 regulates autophagy. *Curr. Biol.* **2017**, *27*, 371–385. [[CrossRef](#)]
87. Galmes, R.; Houcine, A.; Vliet, A.R.; Agostinis, P.; Jackson, C.L.; Giordano, F. ORP5/ORP8 localize to endoplasmic reticulum–mitochondria contacts and are involved in mitochondrial function. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 800–810. [[CrossRef](#)]
88. Tokutake, Y.; Yamada, K.; Ohata, M.; Obayashi, Y.; Tsuchiya, M.; Yonekura, S. ALS-Linked P56S-VAPB mutation impairs the formation of multinuclear myotube in C2C12 Cells. *Int. J. Mol. Sci.* **2015**, *16*, 18628–18641. [[CrossRef](#)]
89. Stoica, R.; De Vos, K.J.; Paillusson, S.; Mueller, S.; Sancho, R.M.; Lau, K.-F.; Vizcay-Barrena, G.; Lin, W.-L.; Xu, Y.-F.; Lewis, J.; et al. ER-Mitochondria associations are regulated by the VAPB–PTPIP51 interaction and are disrupted by ALS/FTD-associated TDP-43. *Nat. Commun.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)]
90. Yamoah, A.; Tripathi, P.; Sechi, A.; Köhler, C.; Guo, H.; Chandrasekar, A.; Nolte, K.W.; Wruck, C.J.; Katona, I.; Anink, J.; et al. Aggregates of RNA binding proteins and ER chaperones linked to exosomes in granulovacuolar degeneration of the Alzheimer’s disease brain. *J. Alzheimer’s Dis. JAD* **2020**, 139–156. [[CrossRef](#)]
91. Llorens-Marítin, M.; Jurado, J.; Hernández, F.; Ávila, J. GSK-3 β , a pivotal kinase in Alzheimer disease. *Front. Mol. Neurosci.* **2014**, *7*. [[CrossRef](#)]
92. Lau, D.H.W.; Paillusson, S.; Hartopp, N.; Rupawala, H.; Mórutz, G.M.; Gomez-Suaga, P.; Greig, J.; Troakes, C.; Noble, W.; Miller, C.C.J. Disruption of endoplasmic reticulum-mitochondria tethering proteins in post-mortem Alzheimer’s disease brain. *Neurobiol. Dis.* **2020**, *143*, 105020. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Hayashi, T.; Su, T.P. σ -1 receptors (σ 1 binding sites) form raft-like microdomains and target lipid droplets on the endoplasmic reticulum: Roles in endoplasmic reticulum lipid compartmentalization and export. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **2003**, *306*, 718–725. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
94. Watanabe, S.; Ilieva, H.; Tamada, H.; Nomura, H.; Komine, O.; Endo, F.; Jin, S.; Mancias, P.; Kiyama, H.; Yamanaka, K. Mitochondria-associated membrane collapse is a common pathomechanism in SIGMAR 1- and SOD 1 -linked ALS. *EMBO Mol. Med.* **2016**, *8*, 1421–1437. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
95. Hayashi, T.; Su, T.P. The potential role of sigma-1 receptors in lipid transport and lipid raft reconstitution in the brain: Implication for drug abuse. *Life Sci.* **2005**, *77*, 1612–1624. [[CrossRef](#)]
96. Gorbatyuk, M.; Gorbatyuk, O. The Molecular Chaperone GRP78/BiP as a Therapeutic Target for Neurodegenerative Disorders: A Mini Review. *J. Genet. Syndr. Gene Ther.* **2013**, *4*. [[CrossRef](#)]
97. Prasad, M.; Pawlak, K.J.; Burak, W.E.; Perry, E.E.; Marshall, B.; Whittal, R.M.; Bose, H.S. Mitochondrial metabolic regulation by GRP78. *Sci. Adv.* **2017**, *3*. [[CrossRef](#)]
98. Hetz, C.; Papa, F.R. The unfolded protein response and cell fate control. *Mol. Cell* **2018**, *69*, 169–181. [[CrossRef](#)]
99. Hoozemans, J.J.M.; van Haastert, E.S.; Nijholt, D.A.T.; Rozemuller, A.J.M.; Scheper, W. Activation of the unfolded protein response is an early event in Alzheimer’s and Parkinson’s disease. *Neurodegener. Dis.* **2012**, *10*, 212–215. [[CrossRef](#)]
100. Uddin, M.S.; Tewari, D.; Sharma, G.; Kabir, M.T.; Barreto, G.E.; Bin-Jumah, M.N.; Perveen, A.; Abdel-Daim, M.M.; Ashraf, G.M. Molecular mechanisms of ER stress and UPR in the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Mol. Neurobiol.* **2020**, *57*, 2902–2919. [[CrossRef](#)]
101. Katayama, T.; Imaizumi, K.; Sato, N.; Miyoshi, K.; Kudo, T.; Hitomi, J.; Morihara, T.; Yoneda, T.; Gomi, F.; Mori, Y.; et al. Presenilin-1 mutations downregulate the signalling pathway of the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **1999**, *1*, 479–485. [[CrossRef](#)]
102. Sadleir, K.R.; Popovic, J.; Vassar, R. ER stress is not elevated in the 5XFAD mouse model of Alzheimer’s disease. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 18434–18443. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

103. Hayashi, T.; Su, T.P. Sigma-1 receptor chaperones at the ER-mitochondrion interface regulate Ca²⁺ signaling and cell survival. *Cell* **2007**, *131*, 596–610. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
104. Hayashi, T.; Su, T.P. Regulating ankyrin dynamics: Roles of sigma-1 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2001**, *98*, 491–496. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
105. Morin-Surun, M.P.; Collin, T.; Denavit-Saubie, M.; Baulieu, E.E.; Monnet, F.P. Intracellular σ 1 receptor modulates phospholipase C and protein kinase C activities in the brainstem. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 8196–8199. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
106. Tsai, S.Y.; Hayashi, T.; Harvey, B.K.; Wang, Y.; Wu, W.W.; Shen, R.F.; Zhang, Y.; Becker, K.G.; Hoffer, B.J.; Su, T.P. Sigma-1 receptors regulate hippocampal dendritic spine formation via a free radical-sensitive mechanism involving Rac1-GTP pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 22468–22473. [[CrossRef](#)]
107. Ryskamp, D.A.; Korban, S.; Zhemkov, V.; Kraskovskaya, N.; Bezprozvanny, I. Neuronal sigma-1 receptors: Signaling functions and protective roles in neurodegenerative diseases. *Front. Neurosci.* **2019**, *13*, 1–20. [[CrossRef](#)]
108. Delprat, B.; Crouzier, L.; Su, T.-P.; Maurice, T. At the crossing of ER stress and MAMs: A key role of Sigma-1 receptor? *Adv. Exp. Med. Biol.* **2020**, *1131*, 699–718. [[CrossRef](#)]
109. Jansen, K.L.R.; Faull, R.L.M.; Storey, P.; Leslie, R.A. Loss of sigma binding sites in the CA1 area of the anterior hippocampus in Alzheimer's disease correlates with CA1 pyramidal cell loss. *Brain Res.* **1993**, *623*, 299–302. [[CrossRef](#)]
110. Fehér, Á.; Juhász, A.; László, A.; Kálmán, J.; Pákáski, M.; Kálmán, J.; Janka, Z. Association between a variant of the sigma-1 receptor gene and Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* **2012**, *517*, 136–139. [[CrossRef](#)]
111. Huang, Y.; Zheng, L.; Halliday, G.; Dobson-Stone, C.; Wang, Y.; Tang, H.-D.; Cao, L.; Deng, Y.-L.; Wang, G.; Zhang, Y.-M.; et al. Genetic polymorphisms in Sigma-1 receptor and apolipoprotein E interact to influence the severity of Alzheimers disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2011**, *8*, 765–770. [[CrossRef](#)]
112. Fisher, A.; Bezprozvanny, I.; Wu, L.; Ryskamp, D.A.; Bar-Ner, N.; Natan, N.; Brandeis, R.; Elkon, H.; Nahum, V.; Gershonov, E.; et al. AF710B, a Novel M1/sigma1 agonist with therapeutic efficacy in animal models of Alzheimer's disease. *Neurodegener. Dis.* **2016**, *16*, 95–110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
113. Hall, H.; Iulita, M.F.; Gubert, P.; Flores Aguilar, L.; Ducatenzeiler, A.; Fisher, A.; Cuello, A.C. AF710B, an M1/sigma-1 receptor agonist with long-lasting disease-modifying properties in a transgenic rat model of Alzheimer's disease. *Alzheimers Dement.* **2018**, *14*, 811–823. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
114. Maurice, T.; Strehaiano, M.; Duhr, F.; Chevallier, N. Amyloid toxicity is enhanced after pharmacological or genetic invalidation of the σ 1 receptor. *Behav. Brain Res.* **2018**, *339*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
115. Lahmy, V.; Meunier, J.; Malmström, S.; Naert, G.; Givalois, L.; Kim, S.H.; Villard, V.; Vamvakides, A.; Maurice, T. Blockade of tau hyperphosphorylation and $\text{A}\beta$ 1-42 generation by the aminotetrahydrofuran derivative ANAVEX2-73, a mixed muscarinic and σ 1 receptor agonist, in a nontransgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Neuropsychopharmacology* **2013**, *38*, 1706–1723. [[CrossRef](#)]
116. Lahmy, V.; Long, R.; Morin, D.; Villard, V.; Maurice, T. Mitochondrial protection by the mixed muscarinic/ σ 1 ligand ANAVEX2-73, a tetrahydrofuran derivative, in $\text{A}\beta$ 25–35 peptide-injected mice, a nontransgenic Alzheimer's disease model. *Front. Cell. Neurosci.* **2015**, *8*, 1–11. [[CrossRef](#)]
117. Tsai, S.Y.A.; Pokrass, M.J.; Klauer, N.R.; Nohara, H.; Su, T.P. Sigma-1 receptor regulates Tau phosphorylation and axon extension by shaping p35 turnover via myristic acid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 6742–6747. [[CrossRef](#)]
118. Verfaillie, T.; Rubio, N.; Garg, A.D.; Bultynck, G.; Rizzuto, R.; Decuyper, J.P.; Piette, J.; Linehan, C.; Gupta, S.; Samali, A.; et al. PERK is required at the ER-mitochondrial contact sites to convey apoptosis after ROS-based ER stress. *Cell Death Differ.* **2012**, *19*, 1880–1891. [[CrossRef](#)]
119. Munoz, J.P.; Ivanova, S.; Sanchez-Wandelmer, J.; Martinez-Cristobal, P.; Noguera, E.; Sancho, A.; Diaz-Ramos, A.; Hernandez-Alvarez, M.I.; Sebastian, D.; Mauvezin, C.; et al. Mfn2 modulates the UPR and mitochondrial function via repression of PERK. *EMBO J.* **2013**, *32*, 2348–2361. [[CrossRef](#)]
120. Toyofuku, T.; Okamoto, Y.; Ishikawa, T.; Sasawatari, S.; Kumanogoh, A. LRRK2 regulates endoplasmic reticulum-mitochondrial tethering through the PERK-mediated ubiquitination pathway. *EMBO J.* **2020**, *39*, e100875. [[CrossRef](#)]
121. Hoozemans, J.J.; Veerhuis, R.; Van Haastert, E.S.; Rozemuller, J.M.; Baas, F.; Eikelenboom, P.; Scheper, W. The unfolded protein response is activated in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol.* **2005**, *110*, 165–172. [[CrossRef](#)]

122. Hoozemans, J.J.; van Haastert, E.S.; Nijholt, D.A.; Rozemuller, A.J.; Eikelenboom, P.; Scheper, W. The unfolded protein response is activated in pretangle neurons in Alzheimer's disease hippocampus. *Am. J. Pathol.* **2009**, *174*, 1241–1251. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
123. Devi, L.; Ohno, M. PERK mediates eIF2alpha phosphorylation responsible for BACE1 elevation, CREB dysfunction and neurodegeneration in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2014**, *35*, 2272–2281. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
124. Ma, T.; Trinh, M.A.; Wexler, A.J.; Bourbon, C.; Gatti, E.; Pierre, P.; Cavener, D.R.; Klann, E. Suppression of eIF2alpha kinases alleviates Alzheimer's disease-related plasticity and memory deficits. *Nat. Neurosci.* **2013**, *16*, 1299–1305. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
125. Page, G.; Rioux Bilan, A.; Ingrand, S.; Lafay-Chebassier, C.; Pain, S.; Perault Pochat, M.C.; Bouras, C.; Bayer, T.; Hugon, J. Activated double-stranded RNA-dependent protein kinase and neuronal death in models of Alzheimer's disease. *Neuroscience* **2006**, *139*, 1343–1354. [[CrossRef](#)]
126. Abisambra, J.F.; Jinwal, U.K.; Blair, L.J.; O'Leary, J.C., 3rd; Li, Q.; Brady, S.; Wang, L.; Guidi, C.E.; Zhang, B.; Nordhues, B.A.; et al. Tau accumulation activates the unfolded protein response by impairing endoplasmic reticulum-associated degradation. *J. Neurosci.* **2013**, *33*, 9498–9507. [[CrossRef](#)]
127. Radford, H.; Moreno, J.A.; Verity, N.; Halliday, M.; Mallucci, G.R. PERK inhibition prevents tau-mediated neurodegeneration in a mouse model of frontotemporal dementia. *Acta Neuropathol.* **2015**, *130*, 633–642. [[CrossRef](#)]
128. Segev, Y.; Barrera, I.; Ounallah-Saad, H.; Wibrand, K.; Sporild, I.; Livne, A.; Rosenberg, T.; David, O.; Mints, M.; Bramham, C.R.; et al. PKR inhibition rescues memory deficit and ATF4 overexpression in ApoE epsilon4 human replacement mice. *J. Neurosci.* **2015**, *35*, 12986–12993. [[CrossRef](#)]
129. O'Connor, T.; Sadleir, K.R.; Maus, E.; Velliquette, R.A.; Zhao, J.; Cole, S.L.; Eimer, W.A.; Hitt, B.; Bembinster, L.A.; Lammich, S.; et al. Phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha increases BACE1 levels and promotes amyloidogenesis. *Neuron* **2008**, *60*, 988–1009. [[CrossRef](#)]
130. Yang, W.; Zhou, X.; Zimmermann, H.R.; Cavener, D.R.; Klann, E.; Ma, T. Repression of the eIF2alpha kinase PERK alleviates mGluR-LTD impairments in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2016**, *41*, 19–24. [[CrossRef](#)]
131. Costa-Mattioli, M.; Gobert, D.; Stern, E.; Gamache, K.; Colina, R.; Cuello, C.; Sossin, W.; Kaufman, R.; Pelletier, J.; Rosenblum, K.; et al. eIF2alpha phosphorylation bidirectionally regulates the switch from short- to long-term synaptic plasticity and memory. *Cell* **2007**, *129*, 195–206. [[CrossRef](#)]
132. Baleriola, J.; Walker, C.A.; Jean, Y.Y.; Crary, J.F.; Troy, C.M.; Nagy, P.L.; Hengst, U. Axonally synthesized ATF4 transmits a neurodegenerative signal across brain regions. *Cell* **2014**, *158*, 1159–1172. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
133. DuBoff, B.; Götz, J.; Feany, M.B. Tau promotes neurodegeneration via DRP1 mislocalization In Vivo. *Neuron* **2012**, *75*, 618–632. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
134. Biswas, J.; Gupta, S.; Verma, D.K.; Gupta, P.; Singh, A.; Tiwari, S.; Goswami, P.; Sharma, S.; Singh, S. Involvement of glucose related energy crisis and endoplasmic reticulum stress: Insinuation of streptozotocin induced Alzheimer's like pathology. *Cell. Signal.* **2018**, *42*, 211–226. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
135. Cui, W.; Wang, S.; Wang, Z.; Wang, Z.; Sun, C.; Zhang, Y. Inhibition of PTEN attenuates endoplasmic reticulum stress and apoptosis via activation of PI3K/AKT pathway in Alzheimer's disease. *Neurochem. Res.* **2017**, *42*, 3052–3060. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
136. Lin, L.; Liu, G.; Yang, L. Crocin improves cognitive behavior in rats with Alzheimer's disease by regulating endoplasmic reticulum stress and apoptosis. *Biomed. Res. Int.* **2019**, *2019*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
137. Reinhardt, S.; Schuck, F.; Grosgen, S.; Riemenschneider, M.; Hartmann, T.; Postina, R.; Grimm, M.; Endres, K. Unfolded protein response signaling by transcription factor XBP-1 regulates ADAM10 and is affected in Alzheimer's disease. *FASEB J.* **2014**, *28*, 978–997. [[CrossRef](#)]
138. Gerakis, Y.; Dunys, J.; Bauer, C.; Checler, F. Aβ42 oligomers modulate β-secretase through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 37436. [[CrossRef](#)]
139. Bussiere, R.; Oules, B.; Mary, A.; Vaillant-Beuchot, L.; Martin, C.; El Manaa, W.; Vallee, D.; Duplan, E.; Paterlini-Brechot, P.; Alves Da Costa, C.; et al. Upregulation of the sarco-endoplasmic reticulum calcium ATPase 1 truncated isoform plays a pathogenic role in Alzheimer's disease. *Cells* **2019**, *8*, 1539. [[CrossRef](#)]
140. Mori, T.; Hayashi, T.; Hayashi, E.; Su, T.P. Sigma-1 receptor chaperone at the ER-Mitochondrion interface mediates the mitochondrion-ER-nucleus signaling for cellular survival. *PLoS ONE* **2013**, *8*. [[CrossRef](#)]

141. Takeda, K.; Nagashima, S.; Shiiba, I.; Uda, A.; Tokuyama, T.; Ito, N.; Fukuda, T.; Matsushita, N.; Ishido, S.; Iwawaki, T.; et al. MITOL prevents ER stress-induced apoptosis by IRE1alpha ubiquitylation at ER-mitochondria contact sites. *EMBO J.* **2019**, *38*, e100999. [[CrossRef](#)]
142. Son, S.M.; Byun, J.; Roh, S.E.; Kim, S.J.; Mook-Jung, I. Reduced IRE1alpha mediates apoptotic cell death by disrupting calcium homeostasis via the InsP3 receptor. *Cell Death Dis.* **2014**, *5*, e1188. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
143. Urano, F.; Wang, X.; Bertolotti, A.; Zhang, Y.; Chung, P.; Harding, H.P.; Ron, D. Coupling of stress in the ER to activation of JNK protein kinases by transmembrane protein kinase IRE1. *Science* **2000**, *287*, 664–666. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
144. Nishitoh, H.; Matsuzawa, A.; Tobiume, K.; Saegusa, K.; Takeda, K.; Inoue, K.; Hori, S.; Kakizuka, A.; Ichijo, H. ASK1 is essential for endoplasmic reticulum stress-induced neuronal cell death triggered by expanded polyglutamine repeats. *Genes Dev.* **2002**, *16*, 1345–1355. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
145. Lee, J.H.; Won, S.M.; Suh, J.; Son, S.J.; Moon, G.J.; Park, U.J.; Gwag, B.J. Induction of the unfolded protein response and cell death pathway in Alzheimer's disease, but not in aged Tg2576 mice. *Exp. Mol. Med.* **2010**, *42*, 386–394. [[CrossRef](#)]
146. Cissé, M.; Duplan, E.; Lorivel, T.; Dunys, J.; Bauer, C.; Meckler, X.; Gerakis, Y.; Lauritzen, I.; Checler, F. The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model. *Mol. Psychiatry* **2017**, *22*, 1562–1575. [[CrossRef](#)]
147. Casas-Tinto, S.; Zhang, Y.; Sanchez-Garcia, J.; Gomez-Velazquez, M.; Rincon-Limas, D.E.; Fernandez-Funez, P. The ER stress factor XBP1s prevents amyloid-beta neurotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* **2011**, *20*, 2144–2160. [[CrossRef](#)]
148. Waldherr, S.M.; Strovast, T.J.; Vadset, T.A.; Liachko, N.F.; Kraemer, B.C. Constitutive XBP-1s-mediated activation of the endoplasmic reticulum unfolded protein response protects against pathological tau. *Nat. Commun.* **2019**, *10*, 4443. [[CrossRef](#)]
149. Acosta-Alvear, D.; Zhou, Y.; Blais, A.; Tsikitis, M.; Lents, N.H.; Arias, C.; Lennon, C.J.; Kluger, Y.; Dynlacht, B.D. XBP1 controls diverse cell type- and condition-specific transcriptional regulatory networks. *Mol. Cell* **2007**, *27*, 53–66. [[CrossRef](#)]
150. Chami, M.; Gozuacik, D.; Saigo, K.; Capiod, T.; Falson, P.; Lecoeur, H.; Urashima, T.; Beckmann, J.; Gougeon, M.L.; Claret, M.; et al. Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis implicates SERCA1 gene in the control of apoptosis. *Oncogene* **2000**, *19*, 2877–2886. [[CrossRef](#)]
151. Chami, M.; Gozuacik, D.; Lagorce, D.; Brini, M.; Falson, P.; Peaucellier, G.; Pinton, P.; Lecoeur, H.; Gougeon, M.L.; le Maire, M.; et al. SERCA1 truncated proteins unable to pump calcium reduce the endoplasmic reticulum calcium concentration and induce apoptosis. *J. Cell Biol.* **2001**, *153*, 1301–1314. [[CrossRef](#)]
152. Chami, M.; Oules, B.; Szabadkai, G.; Tacine, R.; Rizzuto, R.; Paterlini-Brechot, P. Role of SERCA1 truncated isoform in the proapoptotic calcium transfer from ER to mitochondria during ER stress. *Mol. Cell* **2008**, *32*, 641–651. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
153. Xu, Q.; Bernardo, A.; Walker, D.; Kanegawa, T.; Mahley, R.W.; Huang, Y. Profile and regulation of apolipoprotein E (ApoE) expression in the CNS in mice with targeting of green fluorescent protein gene to the ApoE locus. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 4985–4994. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
154. Krasemann, S.; Madore, C.; Cialic, R.; Baufeld, C.; Calcagno, N.; El Fatimy, R.; Beckers, L.; O'Loughlin, E.; Xu, Y.; Fanek, Z.; et al. The TREM2-APOE pathway drives the transcriptional phenotype of dysfunctional microglia in neurodegenerative diseases. *Immunity* **2017**, *47*, 566–581.e9. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
155. Mahley, R.W. Apolipoprotein E: Cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* **1988**, *240*, 622–630. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
156. Lane-Donovan, C.; Wong, W.M.; Durakoglugil, M.S.; Wasser, C.R.; Jiang, S.; Xian, X.; Herz, J. Genetic restoration of plasma apoE improves cognition and partially restores synaptic defects in ApoE-deficient mice. *J. Neurosci.* **2016**, *36*, 10141–10150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
157. Neu, S.C.; Pa, J.; Kukull, W.; Beekly, D.; Kuzma, A.; Gangadharan, P.; Wang, L.-S.; Romero, K.; Arneric, S.P.; Redolfi, A.; et al. Apolipoprotein E genotype and sex risk factors for Alzheimer disease: A meta-analysis. *JAMA Neurol.* **2017**, *74*, 1178–1189. [[CrossRef](#)]
158. Mahley, R.W.; Huang, Y. Apolipoprotein E sets the stage: Response to injury triggers neuropathology. *Neuron* **2012**, *76*, 871–885. [[CrossRef](#)]

159. Castellano, J.M.; Kim, J.; Stewart, F.R.; Jiang, H.; DeMattos, R.B.; Patterson, B.W.; Fagan, A.M.; Morris, J.C.; Mawuenyega, K.G.; Cruchaga, C.; et al. Human apoE isoforms differentially regulate brain amyloid- β peptide clearance. *Sci. Transl. Med.* **2011**, *3*. [[CrossRef](#)]
160. Simonovitch, S.; Schmukler, E.; Masliah, E.; Pinkas-Kramarski, R.; Michaelson, D.M. The Effects of APOE4 on mitochondrial dynamics and proteins in vivo. *J. Alzheimer's Dis.* **2019**, *70*, 861–875. [[CrossRef](#)]
161. Orr, A.L.; Kim, C.; Jimenez-Morales, D.; Newton, B.W.; Johnson, J.R.; Krogan, N.J.; Swaney, D.L.; Mahley, R.W. Neuronal apolipoprotein E4 expression results in proteome-wide alterations and compromises bioenergetic capacity by disrupting mitochondrial function. *J. Alzheimer's Dis.* **2019**, *68*, 991–1011. [[CrossRef](#)]
162. Hayashi, T.; Rizzuto, R.; Hajnoczky, G.; Su, T.-P. MAM: More than just a housekeeper. *Trends Cell Biol.* **2009**, *19*, 81–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
163. Tambini, M.D.; Pera, M.; Kanter, E.; Yang, H.; Guardia-Laguarta, C.; Holtzman, D.; Sulzer, D.; Area-Gomez, E.; Schon, E.A. ApoE4 upregulates the activity of mitochondria-associated ER membranes. *EMBO Rep.* **2016**, *17*, 27–36. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
164. Oikawa, N.; Walter, J. Presenilins and γ -secretase in membrane proteostasis. *Cells* **2019**, *8*, 209. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
165. Neely, K.M.; Green, K.N.; LaFerla, F.M. Presenilin is necessary for efficient proteolysis through the autophagy-lysosome system in a γ -secretase-independent manner. *J. Neurosci.* **2011**, *31*, 2781–2791. [[CrossRef](#)]
166. Száraz, P.; Bánhegyi, G.; Marcolongo, P.; Benedetti, A. Transient knockdown of presenilin-1 provokes endoplasmic reticulum stress related formation of autophagosomes in HepG2 cells. *Arch. Biochem. Biophys.* **2013**, *538*, 57–63. [[CrossRef](#)]
167. Bezprozvanny, I.; Mattson, M.P. Neuronal calcium mishandling and the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* **2008**, *31*, 454–463. [[CrossRef](#)]
168. Tu, H.; Nelson, O.; Bezprozvanny, A.; Wang, Z.; Lee, S.F.; Hao, Y.H.; Serneels, L.; De Strooper, B.; Yu, G.; Bezprozvanny, I. Presenilins form ER Ca²⁺ leak channels, a function disrupted by familial Alzheimer's disease-linked mutations. *Cell* **2006**, *126*, 981–993. [[CrossRef](#)]
169. Green, K.N.; Demuro, A.; Akbari, Y.; Hitt, B.D.; Smith, I.F.; Parker, I.; LaFerla, F.M. SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid β production. *J. Cell Biol.* **2008**, *181*, 1107–1116. [[CrossRef](#)]
170. Stutzmann, G.E.; Caccamo, A.; LaFerla, F.M.; Parker, I. Dysregulated IP₃ signaling in cortical neurons of knock-in mice expressing an Alzheimer's-linked mutation in Presenilin1 results in exaggerated Ca²⁺ signals and altered membrane excitability. *J. Neurosci.* **2004**, *24*, 508–513. [[CrossRef](#)]
171. Area-Gomez, E.; De Groof, A.J.C.; Boldogh, I.; Bird, T.D.; Gibson, G.E.; Koehler, C.M.; Yu, W.H.; Duff, K.E.; Yaffe, M.P.; Pon, L.A.; et al. Presenilins are enriched in endoplasmic reticulum membranes associated with mitochondria. *Am. J. Pathol.* **2009**, *175*, 1810–1816. [[CrossRef](#)]
172. Zampese, E.; Fasolato, C.; Kipanyula, M.J.; Bortolozzi, M.; Pozzan, T.; Pizzo, P. Presenilin 2 modulates endoplasmic reticulum (ER)-mitochondria interactions and Ca²⁺ cross-talk. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, 2777–2782. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
173. Kipanyula, M.J.; Contreras, L.; Zampese, E.; Lazzari, C.; Wong, A.K.C.; Pizzo, P.; Fasolato, C.; Pozzan, T. Ca²⁺ dysregulation in neurons from transgenic mice expressing mutant presenilin 2. *Aging Cell* **2012**, *11*, 885–893. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
174. Fedeli, C.; Filadi, R.; Rossi, A.; Mammucari, C.; Pizzo, P. PSEN2 (presenilin 2) mutants linked to familial Alzheimer disease impair autophagy by altering Ca²⁺ homeostasis. *Autophagy* **2019**, *15*, 2044–2062. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
175. Nelson, O.; Tu, H.; Lei, T.; Bentahir, M.; De Strooper, B.; Bezprozvanny, I. Familial Alzheimer disease-linked mutations specifically disrupt Ca²⁺ leak function of presenilin 1. *J. Clin. Investig.* **2007**, *117*, 1230–1239. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
176. Sepulveda-Falla, D.; Barrera-Ocampo, A.; Hagel, C.; Korwitz, A.; Vinueza-Veloz, M.F.; Zhou, K.; Schonewille, M.; Zhou, H.; Velazquez-Perez, L.; Rodriguez-Labrada, R.; et al. Familial Alzheimer's disease-associated presenilin-1 alters cerebellar activity and calcium homeostasis. *J. Clin. Investig.* **2014**, *124*, 1552–1567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

177. Lee, J.H.; Yu, W.H.; Kumar, A.; Lee, S.; Mohan, P.S.; Peterhoff, C.M.; Wolfe, D.M.; Martinez-Vicente, M.; Massey, A.C.; Sovak, G.; et al. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* **2010**, *141*, 1146–1158. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
178. Müller, U.C.; Zheng, H. Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **2012**, *2*, 1–17. [[CrossRef](#)]
179. Anandatheerthavarada, H.K.; Devi, L. Mitochondrial translocation of amyloid precursor protein and its cleaved products: Relevance to mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.* **2007**, *18*, 343–354. [[CrossRef](#)]
180. Anandatheerthavarada, H.K.; Biswas, G.; Robin, M.A.; Avadhani, N.G. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J. Cell Biol.* **2003**, *161*, 41–54. [[CrossRef](#)]
181. Devi, L.; Prabhu, B.M.; Galati, D.F.; Avadhani, N.G.; Anandatheerthavarada, H.K. Accumulation of amyloid precursor protein in the mitochondrial import channels of human Alzheimer's disease brain is associated with mitochondrial dysfunction. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 9057–9068. [[CrossRef](#)]
182. Pagani, L.; Eckert, A. Amyloid-beta interaction with mitochondria. *Int. J. Alzheimer's Dis.* **2011**, *2011*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
183. Pavlov, P.F.; Wiehager, B.; Sakai, J.; Frykman, S.; Behbahani, H.; Winblad, B.; Ankarcrona, M. Mitochondrial γ -secretase participates in the metabolism of mitochondria-associated amyloid precursor protein. *FASEB J.* **2011**, *25*, 78–88. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
184. Devi, L.; Ohno, M. Mitochondrial dysfunction and accumulation of the β -secretase-cleaved C-terminal fragment of APP in Alzheimer's disease transgenic mice. *Neurobiol. Dis.* **2012**, *45*, 417–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
185. Schreiner, B.; Hedskog, L.; Wiehager, B.; Ankarcrona, M. Amyloid- β peptides are generated in mitochondria-associated endoplasmic reticulum membranes. *J. Alzheimer's Dis.* **2015**, *43*, 369–374. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
186. Pera, M.; Larrea, D.; Guardia-Laguarta, C.; Montesinos, J.; Velasco, K.R.; Agrawal, R.R.; Xu, Y.; Chan, R.B.; Di Paolo, G.; Mehler, M.F.; et al. Increased localization of APP-C99 in mitochondria-associated ER membranes causes mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease. *EMBO J.* **2017**, *36*, 3356–3371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
187. Del Prete, D.; Suski, J.M.; Oulès, B.; Debayle, D.; Gay, A.S.; Lacas-Gervais, S.; Bussiere, R.; Bauer, C.; Pinton, P.; Paterlini-Bréchet, P.; et al. Localization and processing of the amyloid- β protein precursor in mitochondria-associated membranes. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *55*, 1549–1570. [[CrossRef](#)]
188. Hansson, C.A.; Frykman, S.; Farmery, M.R.; Tjernberg, L.O.; Nilsberth, C.; Pursglove, S.E.; Ito, A.; Winblad, B.; Cowburn, R.F.; Thyberg, J.; et al. Nicastrin, presenilin, APH-1, and PEN-2 form active γ -secretase complexes in mitochondria. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 51654–51660. [[CrossRef](#)]
189. Ankarcrona, M.; Hultenby, K. Presenilin-1 is located in rat mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2002**, *295*, 766–770. [[CrossRef](#)]
190. Area-Gomez, E.; Del Carmen Lara Castillo, M.; Tambini, M.D.; Guardia-Laguarta, C.; De Groof, A.J.C.; Madra, M.; Ikenouchi, J.; Umeda, M.; Bird, T.D.; Sturley, S.L.; et al. Upregulated function of mitochondria-associated ER membranes in Alzheimer disease. *EMBO J.* **2012**, *31*, 4106–4123. [[CrossRef](#)]
191. Marquer, C.; Devauges, V.; Cossec, J.C.; Liot, G.; Lécart, S.; Saudou, F.; Duyckaerts, C.; Lévêque-Fort, S.; Potier, M.C. Local cholesterol increase triggers amyloid precursor protein-Bace1 clustering in lipid rafts and rapid endocytosis. *FASEB J.* **2011**, *25*, 1295–1305. [[CrossRef](#)]
192. Cordy, J.M.; Hussain, I.; Dingwall, C.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. Exclusively targeting β -secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates β -site processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 11735–11740. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
193. Vetrivel, K.S.; Cheng, H.; Lin, W.; Sakurai, T.; Li, T.; Nukina, N.; Wong, P.C.; Xu, H.; Thinakaran, G. Association of γ -secretase with lipid rafts in post-golgi and endosome membranes. *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 44945–44954. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
194. Hansson Petersen, C.A.; Alikhani, N.; Behbahani, H.; Wiehager, B.; Pavlov, P.F.; Alafuzoff, I.; Leinonen, V.; Ito, A.; Winblad, B.; Glaser, E.; et al. The amyloid-peptide is imported into mitochondria via the TOM import machinery and localized to mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 13145–13150. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

195. Vargas, T.; Ugalde, C.; Spuch, C.; Antequera, D.; Morán, M.J.; Martín, M.A.; Ferrer, I.; Bermejo-Pareja, F.; Carro, E. A β accumulation in choroid plexus is associated with mitochondrial-induced apoptosis. *Neurobiol. Aging* **2010**, *31*, 1569–1581. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
196. Bobba, A.; Amadoro, G.; Valenti, D.; Corsetti, V.; Lassandro, R.; Atlante, A. Mitochondrial respiratory chain Complexes I and IV are impaired by β -amyloid via direct interaction and through Complex I-dependent ROS production, respectively. *Mitochondrion* **2013**, *13*, 298–311. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
197. Lin, M.T.; Beal, M.F. Alzheimer's APP mangles mitochondria. *Nat. Med.* **2006**, *12*, 1241–1243. [[CrossRef](#)]
198. Pavlov, P.F.; Petersen, C.H.; Glaser, E.; Ankarcrone, M. Mitochondrial accumulation of APP and A β : Significance for Alzheimer disease pathogenesis. *J. Cell. Mol. Med.* **2009**, *13*, 4137–4145. [[CrossRef](#)]
199. Agrawal, R.R.; Montesinos, J.; Larrea, D.; Area-Gomez, E.; Pera, M. The silence of the fats: A MAM's story about Alzheimer. *Neurobiol. Dis.* **2020**, *145*, 105062. [[CrossRef](#)]
200. Kogot-Levin, A.; Saada, A. Ceramide and the mitochondrial respiratory chain. *Biochimie* **2014**, *100*, 88–94. [[CrossRef](#)]
201. Montesinos, J.; Pera, M.; Larrea, D.; Guardia-Laguarta, C.; Agrawal, R.R.; Velasco, K.R.; Yun, T.D.; Stavrovskaya, I.G.; Xu, Y.; Koo, S.Y.; et al. The Alzheimer's disease-associated C99 fragment of APP regulates cellular cholesterol trafficking. *EMBO J.* **2020**, *39*. [[CrossRef](#)]
202. Vaillant-Beuchot, L.; Mary, A.; Pardossi-Piquard, R.; Bourgeois, A.; Lauritzen, I.; Eysert, F.; Kinoshita, P.F.; Cazareth, J.; Badot, C.; Fragaki, K.; et al. Accumulation of amyloid precursor protein C-terminal fragments triggers mitochondrial structure, function, and mitophagy defects in Alzheimer's disease models and human brains. *Acta Neuropathol.* **2020**. [[CrossRef](#)]
203. Ittner, L.M.; Ke, Y.D.; Delerue, F.; Bi, M.; Gladbach, A.; van Eersel, J.; Wölfing, H.; Chieng, B.C.; Christie, M.J.; Napier, I.A.; et al. Dendritic function of tau mediates amyloid- β toxicity in Alzheimer's disease mouse models. *Cell* **2010**, *142*, 387–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
204. Arendt, T.; Stieler, J.T.; Holzer, M. Tau and tauopathies. *Brain Res. Bull.* **2016**, *126*, 238–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
205. Roy, S.; Zhang, B.; Lee, V.M.Y.; Trojanowski, J.Q. Axonal transport defects: A common theme in neurodegenerative diseases. *Acta Neuropathol.* **2005**, *109*, 5–13. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
206. David, D.C.; Hauptmann, S.; Scherping, I.; Schuessel, K.; Keil, U.; Rizzu, P.; Ravid, R.; Dröse, S.; Brandt, U.; Müller, W.E.; et al. Proteomic and functional analyses reveal a mitochondrial dysfunction in P301L tau transgenic mice. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 23802–23814. [[CrossRef](#)]
207. Cummins, N.; Tweedie, A.; Zuryn, S.; Bertran-Gonzalez, J.; Götz, J. Disease-associated tau impairs mitophagy by inhibiting Parkin translocation to mitochondria. *EMBO J.* **2019**, *38*. [[CrossRef](#)]
208. Li, X.C.; Hu, Y.; Wang, Z.H.; Luo, Y.; Zhang, Y.; Liu, X.P.; Feng, Q.; Wang, Q.; Ye, K.; Liu, G.P.; et al. Human wild-type full-length tau accumulation disrupts mitochondrial dynamics and the functions via increasing mitofusins. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 1–10. [[CrossRef](#)]
209. Perreault, S.; Bousquet, O.; Lauzon, M.; Paiement, J.; Leclerc, N. Increased association between rough endoplasmic reticulum membranes and mitochondria in transgenic mice that express P301L Tau. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2009**, *68*, 503–514. [[CrossRef](#)]
210. Ebner, A.; Godemann, R.; Stamer, K.; Illenberger, S.; Trinczek, B.; Mandelkow, E.-M.; Mandelkow, E. Overexpression of Tau protein inhibits kinesin-dependent trafficking of vesicles, mitochondria, and endoplasmic reticulum: Implications for Alzheimer's disease. *J. Cell Biol.* **1998**, *143*, 777–794. [[CrossRef](#)]
211. Afreen, S.; Riherd Methner, D.N.; Ferreira, A. Tau45-230 association with the cytoskeleton and membrane-bound organelles: Functional implications in neurodegeneration. *Neuroscience* **2017**, *362*, 104–117. [[CrossRef](#)]
212. Yoshiyama, Y.; Higuchi, M.; Zhang, B.; Huang, S.M.; Iwata, N.; Saido, T.C.C.; Maeda, J.; Suhara, T.; Trojanowski, J.Q.; Lee, V.M.Y. Synapse loss and microglial activation precede tangles in a P301S tauopathy mouse model. *Neuron* **2007**, *53*, 337–351. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
213. Gong, T.; Wang, Q.; Lin, Z.; Chen, M.L.; Sun, G.Z. Endoplasmic reticulum (ER) stress inhibitor salubrinal protects against ceramide-induced SH-SY5Y cell death. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2012**, *427*, 461–465. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
214. Lee, D.Y.; Lee, K.S.; Lee, H.J.; Kim, D.H.; Noh, Y.H.; Yu, K.; Jung, H.Y.; Lee, S.H.; Lee, J.Y.; Youn, Y.C.; et al. Activation of PERK signaling attenuates A β -mediated ER stress. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e10489. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

215. Huang, X.; Chen, Y.; Zhang, H.; Ma, Q.; Zhang, Y.; Xu, H. Salubrinal attenuates β -amyloid-induced neuronal death and microglial activation by inhibition of the NF- κ B pathway. *Neurobiol. Aging* **2012**, *33*, 1007.e9–1007.e17. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
216. Barreda-Manso, M.A.; Yanguas-Casás, N.; Nieto-Sampedro, M.; Romero-Ramírez, L. Salubrinal inhibits the expression of proteoglycans and favors neurite outgrowth from cortical neurons in vitro. *Exp. Cell Res.* **2015**, *335*, 82–90. [[CrossRef](#)]
217. Paris, D.; Ganey, N.J.; Laporte, V.; Patel, N.S.; Beaulieu-Abdelahad, D.; Bachmeier, C.; March, A.; Ait-Ghezala, G.; Mullan, M.J. Reduction of β -amyloid pathology by celastrol in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *J. Neuroinflamm.* **2010**, *7*, 1–15. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
218. Ho, S.W.; Tsui, Y.T.C.; Wong, T.T.; Cheung, S.K.K.; Goggins, W.B.; Yi, L.M.; Cheng, K.K.; Baum, L. Effects of 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG) in transgenic mouse models of frontotemporal lobar degeneration and Alzheimer's disease. *Transl. Neurodegener.* **2013**, *2*, 1–9. [[CrossRef](#)]
219. Twaroski, Y.; Zaja, C.; Bosnjak, B. Altered Mitochondrial dynamics contributes to propofol-induced cell death in human stem cell-derived neurons. *Physiol. Behav.* **2015**, *123*, 1067–1083. [[CrossRef](#)]
220. Xie, N.; Wang, C.; Lian, Y.; Wu, C.; Zhang, H.; Zhang, Q. Inhibition of mitochondrial fission attenuates A β -induced microglia apoptosis. *Neuroscience* **2014**, *256*, 36–42. [[CrossRef](#)]
221. Reddy, P.H.; Manczak, M.; Yin, X. Mitochondria-Division inhibitor 1 protects against amyloid- β induced mitochondrial fragmentation and synaptic damage in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2017**, *58*, 147–162. [[CrossRef](#)]
222. Yeon, J.Y.; Min, S.H.; Park, H.J.; Kim, J.W.; Lee, Y.H.; Park, S.Y.; Jeong, P.S.; Park, H.; Lee, D.S.; Kim, S.U.; et al. Mdivi-1, mitochondrial fission inhibitor, impairs developmental competence and mitochondrial function of embryos and cells in pigs. *J. Reprod. Dev.* **2015**, *61*, 81–89. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
223. Guo, X.; Disatnik, M.; Monbureau, M.; Shamloo, M.; Mochly-rosen, D.; Qi, X. Inhibition of mitochondrial fragmentation diminishes Huntington's disease-associated neurodegeneration. *J. Clin. Investig.* **2013**, *123*, 5371–5388. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
224. Arismendi-Morillo, G.; Castellano-Ramírez, A.; Seyfried, T.N. Ultrastructural characterization of the Mitochondria-associated membranes abnormalities in human astrocytomas: Functional and therapeutics implications. *Ultrastruct. Pathol.* **2017**, *41*, 234–244. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
225. Lynes, E.M.; Bui, M.; Yap, M.C.; Benson, M.D.; Schneider, B.; Ellgaard, L.; Berthiaume, L.G.; Simmen, T. Palmitoylated TMX and calnexin target to the mitochondria-associated membrane. *EMBO J.* **2012**, *31*, 457–470. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
226. Garrido-Maraver, J.; Loh, S.H.Y.; Martins, L.M. Forcing contacts between mitochondria and the endoplasmic reticulum extends lifespan in a Drosophila model of Alzheimer's disease. *Biol. Open* **2020**, *9*. [[CrossRef](#)]
227. Csordás, G.; Várnai, P.; Golenár, T.; Roy, S.; Purkins, G.; Schneider, T.G.; Balla, T.; Hajnóczky, G. Imaging interorganelle contacts and local calcium dynamics at the ER-mitochondrial interface. *Mol. Cell* **2010**, *39*, 121–132. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
228. Lee, H.J.; Jung, Y.H.; Choi, G.E.; Kim, J.S.; Chae, C.W.; Lim, J.R.; Kim, S.Y.; Yoon, J.H.; Cho, J.H.; Lee, S.J.; et al. Urolithin A suppresses high glucose-induced neuronal amyloidogenesis by modulating TGM2-dependent ER-mitochondria contacts and calcium homeostasis. *Cell Death Differ.* **2020**. [[CrossRef](#)]

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Résumé

La maladie d'Alzheimer (MA) est la pathologie neurodégénérative la plus répandue dans le monde. L'échec des traitements ciblant l'amyloïde beta ($A\beta$), un catabolite de la protéine précurseur de l'amyloïde (APP), souligne le caractère multifactoriel de cette pathologie. Ainsi, différentes études rapportent que les défauts précoces de la structure et de la fonction des mitochondries et la neuroinflammation sont impliqués dans le développement de la MA, et que l'AMPK (AMP-activated protein kinase) est un acteur majeur de l'homéostasie mitochondriale.

L'hypothèse de mon projet est qu'outre le peptide $A\beta$, les fragments C-terminaux (APP-CTFs) contribuent aux dysfonctions mitochondriales et aux défauts de la mitophagie, et que la modulation de l'AMPK pourrait avoir un impact bénéfique dans le contexte de la MA.

Au cours de ma thèse, j'ai démontré que les APP-CTFs s'accumulent dans la mitochondrie des cellules exprimant l'APP portant la double mutation suédoise (SH-SY5Y-APP^{swe}), ou le fragment APP-CTF β : C99 (SH-SY5Y-C99) entraînant une altération de la morphologie des mitochondries, une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROSmit) et un blocage de la mitophagie. Ces effets sont présents chez les souris 3xTgAD et les souris exprimant le fragment C99, et sont exacerbés suite à l'inhibition de la γ -sécrétase, bloquant la production du peptide $A\beta$ et accumulant les APP-CTFs. Enfin, dans des nécropsies de cerveaux de patients avec une forme sporadique de la MA, il y a une accumulation d'APP-CTFs dans les mitochondries, corrélant avec un défaut du processus mitophagique. Ainsi, l'accumulation précoce de ces APP-CTFs et la dysfonction mitochondriale pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques dans le contexte de la MA.

Par ailleurs, j'ai également observé une répression de la cascade AMPK-ULK1 dans les nécropsies de cerveaux de patients Alzheimer sporadiques, dans les modèles d'étude de la MA *in vitro*, et chez les souris symptomatiques 3xTgAD. Nous avons démontré que l'inhibition pharmacologique de l'AMPK augmente l'accumulation des APP-CTFs, exacerbe les défauts de la structure des mitochondries, provoque une hyperpolarisation de la membrane mitochondriale et une augmentation de la production de ROSmit, et inhibe la mitophagie dans les modèles *in vitro*. L'inhibition de l'AMPK affecte également la maturation des épines dendritiques *ex vivo* (coupes d'hippocampes exprimant l'APP^{swe}). A l'inverse, l'activation pharmacologique de l'AMPK permet de réduire le dysfonctionnement mitochondrial (*in vitro*), de favoriser la maturation des épines dendritiques. Nous avons confirmé ces observations par une approche génétique en exprimant des constructions AMPK mutées. De façon importante, l'activation pharmacologique de l'AMPK *in vivo* a permis de réduire la pathologie $A\beta$ et Tau, ainsi que la neuroinflammation et les défauts d'apprentissage chez les souris 3xTgAD symptomatiques. Ainsi, la stimulation de l'AMPK pourrait représenter une nouvelle piste thérapeutique réduisant plusieurs paradigmes associés à la MA.

Mots clés : Maladie d'Alzheimer, AMPK, APP-CTFs, mitochondries, mitophagie, neuroinflammation.

Abstract

Alzheimer's disease (AD) is the most common neurodegenerative disease in the world. Failures of candidate treatments targeting the beta amyloid ($A\beta$), a catabolite originating from the amyloid precursor protein (APP), highlight the multifactorial nature of this pathology. Hence, several works report that the early defects of mitochondrial structure and functions, and the neuroinflammation are implicated in AD development, and that the AMPK (AMP-activated protein kinase) is a master regulator of mitochondrial homeostasis.

The hypothesis of my thesis is that, besides the $A\beta$ peptide, the C-terminals fragments (APP-CTFs) contribute to mitochondrial dysfunctions and that the modulation of the AMPK could hold beneficial effects in AD.

During my thesis, I demonstrated that APP-CTFs accumulate in mitochondria of cells expressing APP with the double Swedish mutation (SH-SY5Y-APP^{swe}), or the APP- β CTF: C99 (SH-SY5Y-C99), causing an alteration of mitochondria morphology, an increase reactive oxygen species (ROSmit) production, and a blockade of mitophagy. These toxic effects were confirmed in 3xTgAD mice and in mice expressing the C99 fragment, and were exacerbated following the inhibition of the γ -secretase, blocking the $A\beta$ production and accumulating APP-CTFs. Finally, we have reported a mitochondrial accumulation of APP-CTFs in brain necropsies of sporadic AD patients correlating with a defective mitophagic phenotype. Hence, the early APP-CTFs accumulation and mitochondrial dysfunctions could be promising novel therapeutic targets in the AD context.

Additionally, I reported a defective AMPK-ULK1 cascade in the brain necropsies of sporadic AD patients, in *in vitro* AD study models, and in symptomatic 3xTgAD mice. Afterward, we have demonstrated that the pharmacological inhibition of AMPK enhances APP-CTFs accumulation, worsen mitochondria structure alterations, triggers mitochondria membrane hyperpolarization, increases ROSmit production, and inhibits mitophagy *in vitro*. AMPK blockade also alters the dendritic spine maturation *ex vivo* (hippocampal slices expressing APP^{swe}). Oppositely, the pharmacological activation of AMPK alleviates mitochondria dysfunctions *in vitro* and favors the dendritic spine maturation. We confirmed these observations using a genetic approach by expressing mutated AMPK constructs. Importantly, pharmacological activation of AMPK reduces $A\beta$ and Tau pathologies, as well as neuroinflammation and learning impairments in symptomatic 3xTgAD mice. Overall, the stimulation of AMPK could stand as a new therapeutic avenue to alleviate AD pathogenesis.

Key words: Alzheimer's disease, AMPK, APP-CTFs, mitochondria, mitophagy, neuroinflammation.