



**HAL**  
open science

# Contribution à l'étude des facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer : analyse de candidats identifiés par étude d'association pangénomique ou GWAS

Charlotte Bauer

## ► To cite this version:

Charlotte Bauer. Contribution à l'étude des facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer : analyse de candidats identifiés par étude d'association pangénomique ou GWAS. Biologie moléculaire. Université Côte d'Azur, 2023. Français. NNT : 2023COAZ6049 . tel-04524702

**HAL Id: tel-04524702**

**<https://theses.hal.science/tel-04524702>**

Submitted on 28 Mar 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

## Contribution à l'étude des facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer

Analyse de candidats identifiés par étude d'association  
pangénomique ou GWAS

**Charlotte BAUER**

IPMC CNRS/UCA UMR7275

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

Dirigée par : **Dr. Frédéric Checler**

Soutenue le : 20 décembre 2023

Devant le jury, composé de :

**Dr. Jean-Charles Lambert**, Institut  
Pasteur de Lille - Président

**Dr. Magalie Lecourtois**, Université de  
Rouen - Rapportrice

**Dr. Kévin Baranger**, UMR7266, La  
Rochelle - Rapporteur

**Dr. Nadine Mestre-Francés**,  
Laboratoire MMDN, Montpellier -  
Examinatrice



# RESUME

La maladie d'Alzheimer (MA) se caractérise par des pertes de mémoire, mais aussi des troubles cognitifs et une perte d'autonomie des patients. C'est une maladie rare avant 65 ans. En effet, environ 1 % des cas de MA surviennent avant cet âge, essentiellement chez des personnes atteintes de formes familiales héréditaires à transmission autosomique dominante. Comme dans toute maladie chronique, il existe aussi une susceptibilité individuelle qui crée un terrain plus ou moins favorable à l'apparition de la maladie en fonction du vieillissement et d'autres facteurs environnementaux. Le risque de développer la MA est généralement multiplié par 1,5 si un parent du premier degré est affecté. Il est multiplié par 2 si deux le sont. Cette susceptibilité individuelle est en partie portée par notre génome. La connaissance des gènes à l'origine de cette susceptibilité, identifiés au cours du Plan Alzheimer (2008-2012) par des études d'associations pangénomiques (ou GWAS pour Genome-Wide Association Study), permet de mieux comprendre comment survient ou peut évoluer la maladie. Ainsi, certains gènes de susceptibilité sont impliqués dans le métabolisme du peptide amyloïde, d'autres interviennent dans le métabolisme des lipides, dans l'immunité innée, dans l'inflammation, dans le fonctionnement synaptique ou celui de l'hippocampe. Cette diversité témoigne de la grande complexité des mécanismes à l'origine de la maladie.

L'un des marqueurs histopathologiques de la MA est l'apparition dans le cerveau de dépôts extracellulaires constitués essentiellement du peptide amyloïde A $\beta$ . Ce peptide est issu du clivage de la protéine  $\beta$ APP (pour  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein) par les activités  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase qui libèrent respectivement les extrémités amino- et carboxy-terminales de ce peptide.

Dans ce mémoire je m'intéresserai plus particulièrement à la protéine SorLA (pour Sorting protein-related receptor containing LDLR class-A repeats), appartenant à la famille de la sortiline, une protéine de transport, et décrite pour la première fois en 1997. Des travaux, réalisés à partir d'autopsies de cerveaux humains, suggèrent l'importance de SorLA dans cet organe. De plus il existe une association entre des variants génétiques du gène *SORL1* de la protéine SorLA (souvent des mutations correspondant à des polymorphismes nucléotidiques simples (SNP)) et des formes familiales tardives de la MA, la désignant comme facteur de risque. Depuis 20 ans, quelques chercheurs proposent que SorLA soit engagée dans le recyclage par endocytose de la protéine  $\beta$ APP.

Plus succinctement, je m'intéresserai également à la protéine Pyk2 (pour Proline-rich tyrosine kinase 2), et son gène *PTK2B* (pour Protein Tyrosine Kinase 2 Bêta), initialement décrite dans les cancers en tant que Focal Adhesion Kinase (FAK) pour ses rôles dans la migration, la survie ou la prolifération, mais de plus en plus étudiée dans la MA car décrite comme un autre facteur de risque par GWAS.

MOTS-CLES : Alzheimer -  $\beta$ APP - peptide amyloïde – GWAS - SorLA - Pyk2

# ABSTRACT

Alzheimer's disease (AD) is characterized by memory loss, cognitive impairment and loss of autonomy. AD is a rare disease before the age of 65. In fact, about 1% of AD patients are younger than 65 and these forms are essentially hereditary familial forms called early onset Familial Alzheimer's disease (FAD). As with any chronic disease, there is an individual susceptibility depending on aging and other environmental factors that promotes more or less the onset of the disease. The risk of developing AD is generally increased by 1.5 if one first-degree parent is affected. It is increased by 2 if two or more are affected. This individual susceptibility is partly determined by our genome. Knowledge of the genes responsible for this susceptibility, identified during the Alzheimer's Plan (2008-2012) by GWAS (Genome-Wide Association Study), provides a better understanding of disease progression. Some susceptibility genes are involved in amyloid peptide metabolism, while others are involved in lipid metabolism, innate immunity, inflammation, synaptic function or hippocampal function. This diversity testifies to the great complexity of the disease's underlying mechanisms.

One of the histopathological markers of AD is the presence in the brain of extracellular deposits consisting mainly of the amyloid A $\beta$  peptide. This peptide is derived from the cleavage of  $\beta$ APP ( $\beta$ -Amyloid Precursor Protein) by  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase activities, which release the peptide's amino- and carboxy-terminal ends respectively.

In this thesis, I will focus on the SorLA protein (Sorting protein-related receptor containing LDLR class-A repeats), a member of the sortilin family of transport proteins first described in 1997. Studies based on autopsies of human brains suggest the importance of SorLA in this organ. In addition, there is an association between genetic variants in the *SORL1* gene (often mutations or SNP for Single Nucleotide Polymorphisms) and late-onset familial forms of AD, making it a risk factor. Over the past 20 years, several researchers have proposed that SorLA is involved in the endocytosis recycling of the  $\beta$ APP protein.

More succinctly, I'll study at the Pyk2 protein (Proline-rich tyrosine kinase 2), and its *PTK2B* gene (Protein Tyrosine Kinase 2 Beta), initially described in cancers as Focal Adhesion Kinase (FAK) for its roles in migration, survival or proliferation, but increasingly studied in AD as described as another risk factor by GWAS.

KEYWORDS: Alzheimer -  $\beta$ APP - amyloid peptide - GWAS - SorLA - Pyk2



# PUBLICATIONS

- 1) The alpha-secretase-derived N-terminal product of cellular prion, N1, displays neuroprotective function in vitro and in vivo.

Guillot-Sestier MV, Sunyach C, **Druon C**, Scarzello S, Checler F. J Biol Chem. **2009** Dec 18;284(51):35973-86. doi: 10.1074/jbc.M109.051086. PMID: 19850936

- 2) Loss of function of DJ-1 triggered by Parkinson's disease-associated mutation is due to proteolytic resistance to caspase-6.

Giaime E, Sunyach C, **Druon C**, Scarzello S, Robert G, Grosso S, Auburger P, Goldberg MS, Shen J, Heutink P, Pouysségur J, Pagès G, Checler F, Alves da Costa C. Cell Death Differ. **2010** Jan;17(1):158-69. doi: 10.1038/cdd.2009.116. PMID: 19680261

- 3) The extracellular regulated kinase-1 (ERK1) controls regulated alpha-secretase-mediated processing, promoter transactivation, and mRNA levels of the cellular prion protein.

Cissé M, Duplan E, Guillot-Sestier MV, Rumigny J, **Bauer C**, Pagès G, Orzechowski HD, Slack BE, Checler F, Vincent B. J Biol Chem. **2011** Aug 19;286(33):29192-29206. doi: 10.1074/jbc.M110.208249. Epub 2011 May 17. PMID: 21586567

## PREMIER AUTEUR

- 4)  $\gamma$ -Secretase-mediated regulation of neprilysin: influence of cell density and aging and modulation by imatinib.

**Bauer C**, Pardossi-Piquard R, Dunys J, Roy M, Checler F. J Alzheimers Dis. **2011**;27(3):511-20. doi: 10.3233/JAD-2011-110746. PMID: 21841248

- 5)  $\alpha$ -Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid  $\beta$  ( $A\beta$ )-associated cell death.

Guillot-Sestier MV, Sunyach C, Ferreira ST, Marzolo MP, **Bauer C**, Thevenet A, Checler F. J Biol Chem. **2012** Feb 10;287(7):5021-32. doi: 10.1074/jbc.M111.323626. Epub 2011 Dec 19. PMID: 22184125

- 6) The  $\beta$ -secretase-derived C-terminal fragment of  $\beta$ APP, C99, but not  $A\beta$ , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus.

Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, **Bauer C**, Brigham E, Abraham JD, Ranaldi S, Fraser P, St-George-Hyslop P, Le Thuc O, Espin V, Chami L, Dunys J, Checler F. J Neurosci. **2012** Nov 14;32(46):16243-1655a. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012. PMID: 23152608

- 7) Parkin differently regulates presenilin-1 and presenilin-2 functions by direct control of their promoter transcription.

Duplan E, Sevalle J, Viotti J, Goiran T, **Bauer C**, Renbaum P, Levy-Lahad E, Gautier CA, Corti O, Leroudier N, Checler F, da Costa CA. *J Mol Cell Biol.* **2013** Apr;5(2):132-42. doi: 10.1093/jmcb/mjt003. Epub 2013 Jan 28. PMID: 23359614

- 8) Study on A $\beta$ 34 biology and detection in transgenic mice brains.

Caillava C, Ranaldi S, Lauritzen I, **Bauer C**, Fareh J, Abraham JD, Checler F. *Neurobiol Aging.* **2014** Jul;35(7):1570-81. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.011. Epub 2014 Jan 11. PMID: 24495834

- 9) Influence of Genetic Background on Apathy-Like Behavior in Triple Transgenic AD Mice.

Pardossi-Piquard R, Lauritzen I, **Bauer C**, Sacco G, Robert P, Checler F. *Curr Alzheimer Res.* **2016**;13(8):942-9. doi: 10.2174/1567205013666160404120106. PMID: 27040141

- 10) MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease.

Baranger K, Marchalant Y, Bonnet AE, Crouzin N, Carrete A, Paumier JM, Py NA, Bernard A, **Bauer C**, Charrat E, Moschke K, Seiki M, Vignes M, Lichtenthaler SF, Checler F, Khrestchatisky M, Rivera S. *Cell Mol Life Sci.* **2016** Jan;73(1):217-36. doi: 10.1007/s00018-015-1992-1. Epub 2015 Jul 23. PMID: 26202697

#### GWAS 1

- 11) ADAM30 Downregulates APP-Linked Defects Through Cathepsin D Activation in Alzheimer's Disease.

Letronne F, Laumet G, Ayrat AM, Chapuis J, Demiautte F, Laga M, Vandenberghe ME, Malmanche N, Leroux F, Eysert F, Sottejeau Y, Chami L, Flaig A, **Bauer C**, Dourlen P, Lesaffre M, Delay C, Huot L, Dumont J, Werkmeister E, Lafont F, Mendes T, Hansmannel F, Dermaut B, Deprez B, Hérard AS, Dhenain M, Souedet N, Pasquier F, Tulasne D, Berr C, Hauw JJ, Lemoine Y, Amouyel P, Mann D, Déprez R, Checler F, Hot D, Delzescaux T, Gevaert K, Lambert JC. *EBioMedicine.* **2016** Jul;9:278-292. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.002. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27333034

- 12) Intraneuronal aggregation of the  $\beta$ -CTF fragment of APP (C99) induces A $\beta$ -independent lysosomal-autophagic pathology.

Lauritzen I, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Pagnotta S, Biferi MG, Barkats M, Lacor P, Klein W, **Bauer C**, Checler F. *Acta Neuropathol.* **2016** Aug;132(2):257-276. doi: 10.1007/s00401-016-1577-6. Epub 2016 Apr 30. PMID: 27138984

13) A $\beta$ 42 oligomers modulate  $\beta$ -secretase through an XBP-1s-dependent pathway involving HRD1.

Gerakis Y, Dunys J, **Bauer C**, Checler F. *Sci Rep.* **2016** Nov 17;6:37436. doi: 10.1038/srep37436. PMID: 27853315

14) Localization and Processing of the Amyloid- $\beta$  Protein Precursor in Mitochondria-Associated Membranes.

Del Prete D, Suski JM, Oulès B, Debayle D, Gay AS, Lacas-Gervais S, Bussiere R, **Bauer C**, Pinton P, Paterlini-Bréchet P, Wieckowski MR, Checler F, Chami M. *J Alzheimers Dis.* **2017**;55(4):1549-1570. doi: 10.3233/JAD-160953. PMID: 27911326

15) MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking in vitro.

Baranger K, Bonnet AE, Girard SD, Paumier JM, García-González L, Elmanaa W, Bernard A, Charrat E, Stephan D, **Bauer C**, Moschke K, Lichtenthaler SF, Roman FS, Checler F, Khrestchatisky M, Rivera S. *Front Mol Neurosci.* **2017** Jan 10;9:163. doi: 10.3389/fnmol.2016.00163. eCollection 2016. PMID: 28119565

## GWAS 2

16) Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism.

Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysert F, Pottiez V, Deloison G, Vandeputte A, Ayrat AM, Mendes T, Desai S, Goate AM, Kauwe JSK, Leroux F, Herledan A, Demiautte F, **Bauer C**, Checler F, Petersen RC, Blennow K, Zetterberg H, Minthon L, Van Deerlin VM, Lee VM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Albert M, Moghekar A, O'Brien R, Peskind ER, Malmanche N, Schellenberg GD, Dourlen P, Song OR, Cruchaga C, Amouyel P, Deprez B, Brodin P, Lambert JC; ADGC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Acta Neuropathol.* **2017** Jun;133(6):955-966. doi: 10.1007/s00401-016-1652-z. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27933404

17) Post-translational remodeling of ryanodine receptor induces calcium leak leading to Alzheimer's disease-like pathologies and cognitive deficits.

Lacampagne A, Liu X, Reiken S, Bussiere R, Meli AC, Lauritzen I, Teich AF, Zalk R, Saint N, Arancio O, **Bauer C**, Duprat F, Briggs CA, Chakroborty S, Stutzmann GE, Shelanski ML, Checler F, Chami M, Marks AR. *Acta Neuropathol.* **2017** Nov;134(5):749-767. doi: 10.1007/s00401-017-1733-7. Epub 2017 Jun 19. PMID: 28631094

18) The transcription factor XBP1s restores hippocampal synaptic plasticity and memory by control of the Kalirin-7 pathway in Alzheimer model.

Cissé M, Duplan E, Lorivel T, Dunys J, **Bauer C**, Meckler X, Gerakis Y, Lauritzen I, Checler F. *Mol Psychiatry.* **2017** Nov;22(11):1562-1575. doi: 10.1038/mp.2016.152. Epub 2016 Sep 20. PMID: 27646263

19) Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3xTgAD and 2xTgAD mice.

Bourgeois A, Lauritzen I, Lorivel T, **Bauer C**, Checler F, Pardossi-Piquard R. *Neurobiol Aging*. **2018** Nov;71:21-31. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.038. Epub 2018 Jul 12. PMID: 30071370

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

Vaillant-Beuchot L, Mary A, Pardossi-Piquard R, Bourgeois A, Lauritzen I, Eysert F, Kinoshita PF, Cazareth J, Badot C, Fragaki K, Bussiere R, Martin C, Mary R, **Bauer C**, Pagnotta S, Paquis-Flucklinger V, Buée-Scherrer V, Buée L, Lacas-Gervais S, Checler F, Chami M. *Acta Neuropathol*. **2021** Jan;141(1):39-65. doi: 10.1007/s00401-020-02234-7. Epub 2020 Oct 20. PMID: 33079262

### GWAS3

21) Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner.

Eysert F, Coulon A, Boscher E, Vreux AC, Flaig A, Mendes T, Hughes S, Grenier-Boley B, Hanouille X, Demiautte F, **Bauer C**, Marttinen M, Takalo M, Amouyel P, Desai S, Pike I, Hiltunen M, Chécler F, Farinelli M, Delay C, Malmanche N, Hébert SS, Dumont J, Kilinc D, Lambert JC, Chapuis J. *Mol Psychiatry*. **2021** Oct;26(10):5592-5607. doi: 10.1038/s41380-020-00926-w. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33144711

# REMERCIEMENTS

Mes premiers remerciements vont au Dr. Magalie Lecourtois et au Dr. Kévin Baranger pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse et d'avoir pris le temps d'évaluer mon travail.

Kévin, je suis heureuse de t'avoir dans mon jury. Ton séjour dans notre laboratoire, il y a de ça plusieurs années, m'avait quelque peu stressée. Moi, toute jeune technicienne, qui devait te former à l'activité gamma-sécrétase in vitro ... Mais tu as su me rassurer. Ta sympathie et ta simplicité m'ont rapidement mise à l'aise. Merci pour ta présence aujourd'hui.

Je souhaite ensuite remercier le Dr. Jean-Charles Lambert pour avoir accepté de juger ce travail de thèse. Déjà, à l'époque, nos collaborations sur les facteurs de risque ADAM30 et FERMT2 m'avaient permis de mettre un pied dans cet univers vaste et compliqué des GWAS. Participer à la première réunion DISTALZ à Lille m'avait également permis de m'initier au Welsh. Merci !

Mes remerciements s'adressent aussi au Dr. Nadine Mestre-Francés et au Dr. Patrick Auberger pour avoir suivi avec attention mon projet de thèse lors des comités de suivi de thèse, de m'avoir encouragée et conseillée.

Nadine, merci du fond du cœur pour votre présence en ce jour si symbolique. En 2015, on se rencontrait à Montpellier lors de mon premier module du diplôme SVT de l'EPHE. En 2018, je soutenais et votre présence était déjà synonyme de bienveillance. En 2019, je vous demandais une lettre de recommandation pour m'inscrire en thèse et vos premiers mots ont été « Je t'en sais capable ». Nous voilà le 20 décembre 2023 et vous êtes toujours présente, persuadée de mes capacités. J'espère plus que tout ne pas vous décevoir.

Patrick, comme je vous l'ai écrit par e-mail, votre présence aurait été tellement importante pour moi. Vous êtes le premier maillon de la longue chaîne qui nous amène à ce jour. 2005 ! L'année où j'ai réalisé mon stage GRETA dans votre laboratoire. 8 semaines entre janvier et février qui auraient pu se terminer comme ça. Mais non ! J'apprends par Frédéric que si je suis aujourd'hui statutaire dans son laboratoire c'est un peu grâce à vous, à la bonne impression que je vous ai laissée : sérieuse et motivée. Comme Nadine, vous étiez présent en 2018, vous me félicitez et comme Nadine, vous avez accepté de m'aiguiller au fil de ces 4 années de thèse. Mille mercis !

Bien évidemment mes remerciements vont ensuite au Dr. Frédéric Checler, mon chef, mon directeur de thèse. Fred, si je peux me permettre, je vous exprime ma plus grande gratitude. Vous m'avez permis de grandir, de murir, de rester curieuse, passionnée, attachée aux sciences. Vous avez cru en moi, vous m'avez soutenue, vous n'avez pas douté. Merci ! Je vous souhaite le meilleur pour la suite qui sera quelque peu différente en 2024.

Je souhaite ensuite remercier « l'équipe FC en liesse ». Les anciens (Aurélie T, Céline C, Claire S, Corinne K, Emilie G, Jean S, Mavie-Victoire, Virginie B) qui m'ont accueillie et formée dès le départ pour être la lab manager que je suis aujourd'hui. Merci aux jeunes et moins jeunes qui étaient de passage dans l'équipe et avec qui j'ai partagé d'agréables moments (Alexandre, Anaïs B, Arnaud, Audrey V, Aurore B, Dolores, Elissa, Elodie M, Guillaume, Julien V, Ligia, Lila, Loan V, Paula K, Renaud, Sébastien G, Thomas G, Wejdane, Yannis). Merci à ceux qui restent, le noyau dur (Bruno, Cristine, Eric, Fanny, Inger, Julie, Mounia et Raph) qui m'accompagnent chaque jour et avec qui j'apprécie d'échanger et d'apprendre. Merci Julia pour ta gestion exemplaire et ton aide administrative. Merci, enfin, aux petits derniers à qui je souhaite de terminer en beauté (Céline, Gwendoline, Juliane et Julien).

Mes remerciements vont aussi aux différentes plateformes de l'institut : séquençage (Nathalie), imagerie (Sophie et Frédéric) et animalerie (Camille, Véra, Véronique, Alain, Benjamin, Nicolas, Thomas L). Merci Christophe et Yohan de l'atelier. Merci à la SBEA et à tous ses membres qui m'ont accompagnée pendant 5 années. Je vous ai lâchement abandonné début 2022 pour me consacrer pleinement à mon projet de thèse. Merci Emilie et Pauline d'avoir repris le bébé. Promis, je serai de retour en 2024. Merci à Franck A pour ses superbes diaporamas dont lui seul a le secret.

Je tiens à remercier « Les Gonz à Marseille » : Gwen et Véro ! Nos escapades dans la cité phocéenne pour les formations en expérimentation animale étaient un vrai plaisir. Nos repas avant chaque réunion SBEA un vrai régal. Ces 4 années ont fait que j'étais beaucoup moins présente. Je m'en excuse sincèrement.

Ces remerciements ne seraient pas complets si je n'évoquais pas ma famille, mon socle. Merci à ma marraine Nathalie qui m'a fait découvrir la biochimie, ce qui m'a donné l'envie en 4<sup>ème</sup> de réaliser un stage dans un laboratoire d'analyses. Je pense également à mes grands-parents, ceux partis trop tôt (Papapa et Mamama) et ceux dont je peux encore profiter (Papy et Mamie). Mamie, je te sais particulièrement concernée par la maladie d'Alzheimer dont ta sœur Solange a souffert. Ce travail est pour vous aussi. Je remercie mes 3 sisters (Lulu, Mimi et Titi) de m'avoir pris comme modèle dès votre plus jeune âge. J'ai essayé de montrer l'exemple, comme on dit, et à mon tour je souhaite vous écrire que je suis fière de vous. Merci Papa. Merci Maman. Merci Vivi. Merci Rémi. Vivi, Rémi, être beau-parent n'est pas simple, je l'ai découvert avec le temps. Merci pour votre soutien et votre amour. Papa, Maman, merci pour tout. Papa, même à des centaines de kilomètres, tu as toujours été présent et mon plus grand fan. Maman, à une époque j'ai du me plaire de ta « sévérité », aujourd'hui je te remercie de tout mon cœur pour la femme que je suis aujourd'hui. Je vous aime tous.

Enfin, le bouquet final ! Je remercie immensément mes 2 amours, mes 2 hommes : Stefano et Pietro. Stefano, nos regards se sont croisés à l'IPMC en 2007 et depuis je ne cesse de t'aimer. Merci pour ton soutien, tes encouragements, tes préparations aux concours, ... Prends de la hauteur, ton conseil préféré ! Merci de croire en moi et d'avoir accepté que je me concentre sur mon mémoire et ma soutenance au

détriment de nos soirées, de nos weekends. Tu es mon roc, je t'aime. Pietro, mon petit mec, ta venue miraculeuse, même peu de temps après mon début de thèse, est mon plus beau souvenir. Avec les yeux de maman et le caractère de papa, tu es notre mix parfait, notre expérience finale la plus réussie. Tu nous combles de bonheur et je te souhaite de t'émerveiller et de croquer la vie à pleines dents. Je t'aime mon fils.

# ABBREVIATIONS

a.a : acides aminés

AAC : Angiopathie Amyloïde Cérébrale

AD : Alzheimer's Disease

ADAM : A Disintegrin And Metalloprotease

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

AEP : Asparagine EndoPeptidase

AGE : Advanced Glycosylation End products

AICD : Amyloid precursor protein IntraCellular Domain

AITCP : Adhesion Induced T Cell Priming

AK1 : Adénylate Kinase 1

ALID (1, 2) : APP-Like Intracellular Domain

AMPA : Alpha-Methyl-Propionic Acid

AMPC : Adénosine MonoPhosphate cyclique

AMPK : AMP-activated protein Kinase

AP1 : Activating Protein-1

AP-2 : Adaptor Protein-2

APA : AminoPeptidase A

Aph1 : Anterior pharynx-defective 1

APLP (1, 2) : Amyloid Precursor-Like Proteins

ApoE : Apolipoprotein E

ApoER2 : Apolipoprotein E Receptor 2

ARNm : Acide RiboNucléique messenger

Atg : Autophagy-related protein

ATP : Adenosine TriPhosphate

A $\beta$  :  $\beta$ -amyloïde peptide

BACE (1, 2) : Beta-site APP Cleaving Enzyme

Bax : BCL2 associated x



BHE : Barrière Hémato-Encéphalique  
Bin1 : Bridging integrator 1  
CA (1, 3) : Corne d'Ammon  
CASK : Calcium/calmodulin dependent Serine protein Kinase  
CD147 : cluster of differentiation 147  
CD2AP : CD2 Associated Protein  
Cdk5 : Cyclin-dependent kinase 5  
CHO : Chinese Hamster Ovary  
CLU : Clusterin  
CMA : Chaperone-Mediated Autophagy  
CR1 : Complement Receptor type 1  
C-ter : C-terminal  
Dab (1, 2) : Disabled  
DAPT : N-[N-(3, 5-difluorophenacetyl)-l-alanyl]-s-phenylglycine-butyl ester  
DNF : Dégénérescence NeuroFibrillaire  
EGF : Epidermal Growth Factor  
ELISA : Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
EOAD : Early-Onset Alzheimer's Disease  
FAD : Familial Alzheimer's Disease  
FAK : Focal Adhesion Kinase  
FDA : Food and Drug Administration  
FERM : Four point-1, Ezrin, Radixin and Moesin  
FERMT2 : FERM Domain Containing Kindlin 2  
Fe65 : ou APBB1 pour Amyloid-beta A4 Precursor protein-Binding family B member 1  
FTD : FrontoTemporal Dementia  
FTDP-17 : FrontoTemporal Dementia and Parkinsonism linked to chromosome 17  
GGA : Golgi-localized,  $\gamma$ -ear containing, ADP-ribosylation factor binding  
Grb2 : Growth factor receptor-bound protein 2  
GSAP : Gamma-Secretase Activating Protein

GSK3 $\beta$  : Glycogen Synthase Kinase-3 beta  
GWAS : Genome-Wide Association Study  
HDL : High-Density Lipoprotein  
HEK-293 : Human Embryonic Kidney 293  
Hsc70 : Heat shock cognate 71 kDa protein  
IDE : Insulin-Degrading Enzyme  
IL (1, 6, 10) : InterLeukine  
iPSC : induced Pluripotent Stem Cells  
IR : Insulin Receptor  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
ITAM : Immuno receptor Tyrosine-based Activation Motif  
Jip : JNK-interacting protein  
KI : Knock-In  
KO : Knock-Out  
KPI : Kunitz Protease Inhibitor  
KUZ : Kuzbanian  
Lamp2A : Lysosome-associated membrane protein type 2A  
Lck : Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase  
LCS : Liquide CérébroSpinal  
LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor  
LOAD : Late-Onset Alzheimer's Disease  
Lrad3 : LDLR class A domain-containing protein 3  
LRP1 : Low density lipoprotein Receptor-related Protein 1  
LTP : Potentialisation à Long Terme  
MA : Maladie d'Alzheimer  
MAM : Mitochondria Associated endoplasmic reticulum Membranes  
MAPT : Microtubule Associated Protein Tau  
MCI : Mild Cognitive Impairment  
MEC : Matrice ExtraCellulaire

MEF : Mouse Embryonic Fibroblasts  
mGluR5 : metabotropic Glutamate Receptor 5  
Mint1 : ou APBA1 pour APP Binding family A member 1  
MT5-MMP : Membrane-Type 5-Matrix MetalloProteinase  
MVB : MultiVesicular Bodies  
NCT : Nicastrin  
NMDA : N-Méthyl-D-Aspartate  
NO : Oxyde Nitrique ou Monoxyde d'Azote  
NSAID : Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs  
N-ter : N-terminal  
OH : Radical hydroxyle  
OR : Odds Ratio  
Pen2 : Presenilin enhancer 2  
PET-scan : Tomographie par Émission de Positrons  
PHF : Paired Helical Filaments  
PICALM : Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein  
PKC : Protéine Kinase C  
PLA : Proximity Ligation Assay  
PLD (1, 3) : PhosphoLipase D  
PreP : Presequence Protease  
pro-TNF : pro-Tumor Necrosis Factor  
PrPc : Cellular Prion Protein  
PS ou PSEN : Presenilin  
PTB : PhosphoTyrosin Binding  
PTK2 : Protein Tyrosine Kinase 2  
PTK2B : Protein Tyrosine Kinase 2 Beta  
PTV : Protein-Truncating Variants  
Pyk2 : Proline-rich tyrosine kinase 2  
RAGE : Receptor for Advanced Glycation End products

RE : Réticulum Endoplasmique  
ROS : Reactive Oxygen Species  
sAPP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) : soluble Amyloid Precursor Protein  
SGZ : SubGranular Zone  
SH2 : Src-Homology 2  
SNC : Système Nerveux Central  
SNP : Single Nucleotide Polymorphism  
SNX (1, 2, 5, 6, 17) : Sorting Nexin 17  
SORCS (1, 2, 3) : Sortilin Related VPS10 Domain Containing Receptor 1  
SORL1 : Sortilin Related receptor 1  
SorLA : Sorting protein-related receptor containing LDLR class A repeats  
STEP : Striatal-enriched protein Tyrosine Phosphatase  
SVF : Sérum de Veau Foetal  
TACE : Tumor necrosis factor-alpha Converting Enzyme  
tau : tubulin-associated unit  
TGF- $\alpha$  : Transforming Growth Factor alpha  
TGN : Trans-Golgi Network  
TIM : Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane  
TMP21 : ou TMED10 pour Transmembrane P24 Trafficking Protein 10  
TNF $\alpha$  : Tumor Necrosis Factor alpha  
TOM : Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane  
TREM2 : Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2  
VBM : Voxel-Based Morphometry  
VLDL : Very Low Density Lipoprotein  
VLDLR : Very Low Density Lipoprotein Receptor  
Vps (10p, 26, 29, 35) : Vacuolar protein sorting  
ZAP70 : Zeta-Associated Protein 70  
 $\beta$ APP :  $\beta$ -Amyloïd Precursor Protein

# LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Le Dr. Alzheimer et sa patiente

Figure 2 : Les lésions de la maladie d'Alzheimer

Figure 3 : L'IRM comparative d'un sujet sain et d'un patient Alzheimer

Figure 4 : Les dessins originaux du Dr. Alzheimer

Figure 5 : Les plaques amyloïdes

Figure 6 : L'hypothèse de la cascade amyloïde

Figure 7 : La structure de 3 isoformes de la protéine  $\beta$ APP

Figure 8 : La voie non-amyloïdogène

Figure 9 : La voie amyloïdogène

Figure 10 : Formation du complexe  $\gamma$ -sécrétase et rôles des sous-unités

Figure 11 : Les 2 voies de clivages générant le peptide  $A\beta$  40 et le peptide  $A\beta$  42

Figure 12 : Les différents fragments issus de la protéine  $\beta$ APP suite à l'action des sécrétases

Figure 13 : Les 3 formes d'autophagie

Figure 14 : Le métabolisme de la protéine  $\beta$ APP au niveau des mitochondries

Figure 15 : Le trafic de la protéine  $\beta$ APP

Figure 16 : Quelques exemples de peptides amyloïdes  $A\beta$  parmi plus de 100 variants différents

Figure 17 : L'accumulation intracellulaire du peptide amyloïde  $A\beta$

Figure 18 : Les mutations sur le gène *APP*

Figure 19 : Les mutations sur le gène *PSEN1*

Figure 20 : Les mutations sur le gène *PSEN2*

Figure 21 : Toutes les formes de la maladie d'Alzheimer

Figure 22 : Les 75 candidats identifiés par GWAS impliqués dans la maladie d'Alzheimer

Figure 23 : L'organisation structurale de la protéine SorLA

Figure 24 : Le rôle de la protéine SorLA dans le métabolisme de la protéine  $\beta$ APP

Figure 25 : La structure de la protéine Pyk2

Figure 26 : Le rôle potentiel de la protéine Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer

Figure 27 : Les mutations identifiées sur le gène *SORL1*

Figure 28 : La localisation de la mutation Y402F sur la protéine Pyk2

Figure 29 : expression de  $\beta$ APP dans les cellules HEK-293 transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> et Pyk2<sup>Y402F</sup>

Figure 30 : sécrétion de sAPP $\alpha$  dans les cellules HEK-293 transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> et Pyk2<sup>Y402F</sup>

Figure 31 : expression de C99 et C83 dans les cellules HEK-293 transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> et Pyk2<sup>Y402F</sup>

Figure 32 : expression de  $\beta$ APP dans les cellules SH-SY5Y transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> et Pyk2<sup>Y402F</sup>

Figure 33 : sécrétion de sAPP $\alpha$  dans les cellules SH-SY5Y transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> et Pyk2<sup>Y402F</sup>

Figure 34 : expression de p53 et Pyk2 dans les cellules MEF Arf<sup>-/-</sup> et MEF Arf<sup>-/-</sup> ; p53<sup>-/-</sup>

Figure 35 : activité transcriptionnelle de p53 dans les cellules MEF Arf<sup>-/-</sup> et MEF Arf<sup>-/-</sup> ; p53<sup>-/-</sup> transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> et Pyk2<sup>Y402F</sup>

Figure 36 : expression de Pyk2 et p53 après traitement 16h de l'inhibiteur PF-431396 dans les cellules MEF Arf<sup>-/-</sup> et MEF Arf<sup>-/-</sup> ; p53<sup>-/-</sup>

# TABLE DES MATIERES

|   |    |
|---|----|
| 1-INTRODUCTION.....   | 21 |
| 2-LA MALADIE D'ALZHEIMER.....   | 21 |
| A-Les aspects cliniques.....  | 21 |
| a- Les symptômes de la MA.....  | 22 |
| b- Le diagnostic de la MA.....  | 23 |
| 1- Le diagnostic clinique de démence.....   | 23 |
| 2- Le diagnostic différentiel.....  | 23 |
| 3- Le diagnostic certain post-mortem.....   | 23 |
| c- Le traitement actuel de la MA.....   | 25 |
| B-Les aspects histologiques.....  | 26 |
| a- Les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires ou DNF.....                 | 27 |
| b- Les dépôts amyloïdes extracellulaires.....   | 28 |
| c- Les lésions vasculaires.....   | 30 |
| d- Les autres lésions.....  | 30 |
| 1- L'atrophie cérébrale.....  | 30 |
| 2- La perte neuronale.....  | 31 |
| 3- La perte synaptique.....   | 31 |
| 4- Les réponses gliales.....  | 31 |
| 3-LA CASCADE AMYLOIDE.....  | 32 |
| A-Une hypothèse incomplète ?.....   | 34 |
| a- Les mutations du gène de la protéine tau.....                                      | 35 |
| b- Les plaques séniles se formeraient avant les DNF.....                              | 35 |
| c- Le peptide A $\beta$ favorise l'hyperphosphorylation de tau.....                   | 35 |
| d- L'injection intracérébrale d'A $\beta$ augmente les DNF.....                       | 36 |
| e- Le peptide A $\beta$ déclenche la synaptopathie.....                               | 36 |
| f- La corrélation entre l'allèle e4 d'APOE et l'augmentation des plaques séniles..... | 37 |
| g- Une mutation protectrice sur le gène de $\beta$ APP.....                           | 38 |
| 4-LA PROTEINE $\beta$ APP ET SA MATURATION PROTEOLYTIQUE.....                         | 39 |
| A-Les fonctions physiologiques de $\beta$ APP.....                                    | 41 |
| B-La maturation physiologique de la protéine $\beta$ APP.....                         | 43 |
| a- La voie non-amyloïdogène.....  | 44 |
| 1- L' $\alpha$ -sécrétase.....  | 45 |
| b- La voie amyloïdogène.....  | 47 |
| 1- La $\beta$ -sécrétase.....   | 48 |

|  |    |
|--|----|
| 2- Le clivage $\gamma$ -sécrétase.....   | 50 |
| 3- La formation du complexe $\gamma$ -sécrétase.....                                     | 53 |
| 4- Les mécanismes de clivage de la $\gamma$ -sécrétase.....                              | 54 |
| 5- La régulation de la $\gamma$ -sécrétase.....  | 56 |
| 6- L'activité $\gamma$ -sécrétase indépendante des PS.....                               | 57 |
| 7- Les fragments protéolytiques de la protéine $\beta$ APP.....                          | 57 |
| 8- Le métabolisme de $\beta$ APP par l' $\eta$ -sécrétase.....                           | 61 |
| 9- Le métabolisme de $\beta$ APP de la $\delta$ -sécrétase.....                          | 61 |
| 10- Les autres voies de clivage de $\beta$ APP.....                                      | 62 |
| C-L'homéostasie et la régulation du métabolisme de $\beta$ APP.....                      | 62 |
| a- Protéasome.....   | 64 |
| b- Autophagie.....   | 64 |
| c- Métabolisme de $\beta$ APP et production d' $A\beta$ au niveau des mitochondries...66 | 66 |
| D-Le trafic de la protéine $\beta$ APP.....  | 67 |
| a- Le complexe rétromère.....  | 69 |
| b- Les récepteurs de lipoprotéines de faibles densités.....                              | 70 |
| 5-LE PEPTIDE AMYLOÏDE $A\beta$ .....   | 72 |
| A-Les différentes espèces de peptide amyloïde $A\beta$ .....                             | 73 |
| a- Les formes tronquées en N-ter du peptide amyloïde $A\beta$ .....                      | 74 |
| 1- $A\beta$ 2-x.....   | 74 |
| 2- $A\beta$ 4-x.....   | 75 |
| 3- $A\beta$ 11-x et $A\beta$ 17-x.....   | 75 |
| b- Les formes tronquées du peptide amyloïde $A\beta$ en C-ter.....                       | 76 |
| 1- $A\beta$ x-34.....  | 76 |
| 2- $A\beta$ x-37, 38 et 39.....  | 76 |
| c- La forme particulière du peptide amyloïde $A\beta$ pyroglutamate 3-x.....             | 77 |
| B-La localisation intracellulaire du peptide $A\beta$ .....                              | 78 |
| C-Les fonctions physiologiques du peptide amyloïde $A\beta$ .....                        | 79 |
| D-Le transport et l'élimination du peptide $A\beta$ .....                                | 80 |
| E-Le rôle du peptide $A\beta$ dans la physiopathologie de la MA.....                     | 81 |
| a- La pathogénicité d' $A\beta$ .....  | 81 |
| 1- L'oligomérisation et la fibrillogénèse.....   | 82 |
| 2- Les mécanismes.....   | 82 |
| 3- Les autres mécanismes neurotoxiques d' $A\beta$ .....                                 | 83 |
| 6-LES DIFFERENTS FACTEURS DE LA MA.....  | 84 |



|   |     |
|---|-----|
| A-L'âge.....  | 84  |
| B-Le terrain génétique.....   | 84  |
| a- Les formes monogéniques de la MA.....  | 86  |
| 1- Les mutations sur le gène <i>APP</i> .....   | 86  |
| 2- Les mutations sur le gène <i>PSEN1</i> .....   | 89  |
| 3- Les mutations sur le gène <i>PSEN2</i> .....   | 90  |
| b- Les formes familiales sans transmission mendélienne classique.....   | 91  |
| c- Les formes sporadiques.....  | 91  |
| 1- Les facteurs de risque génétique.....  | 92  |
| C-Les facteurs environnementaux.....  | 101 |
| a- Les facteurs socio-économiques.....  | 101 |
| b- Les facteurs vasculaires et métaboliques.....  | 101 |
| 1- Les maladies cérébrovasculaires.....   | 101 |
| 2- L'hyperinsulinémie et le diabète de type II.....   | 102 |
| 3- La dyslipidémie et l'obésité.....  | 102 |
| c- Le stress oxydatif.....  | 103 |
| d- Les expositions environnementales.....   | 103 |
| D-Les facteurs protecteurs.....   | 103 |
| 7-SORLA.....  | 104 |
| 8-PYK2.....   | 108 |
| 9-OBJECTIFS.....  | 112 |
| A-Objectif 1.....   | 113 |
| B-Résultats 1.....  | 114 |
| a- Expression et devenir des mutants de la protéine SorLA.....  | 114 |
| b- Influence de SorLA <sup>WT</sup> et de ses mutants sur l'expression de $\beta$ APP et sur ses fragments non-amyloïdogènes.....                                   | 114 |
| c- Influence de SorLA <sup>WT</sup> et ses mutants sur le peptide A $\beta$ et sur l'expression et l'activité de la $\gamma$ -sécrétase.....                        | 115 |
| d- Influence de SorLA <sup>WT</sup> et ses mutants sur les fragments C-ter de $\beta$ APP et sur l'activité $\beta$ -sécrétase.....                                 | 115 |
| e- Influence de SorLA <sup>WT</sup> et ses mutants sur la néprilysine et la cathepsine B.....   | 116 |
| f- Discussion.....  | 116 |
| ARTICLE : Potentially Pathogenic SORL1 Mutations Observed in Autosomal-Dominant Cases of Alzheimer's Disease Do Not Modulate APP Physiopathological Processing..... | 118 |
| C-Objectif 2.....   | 138 |

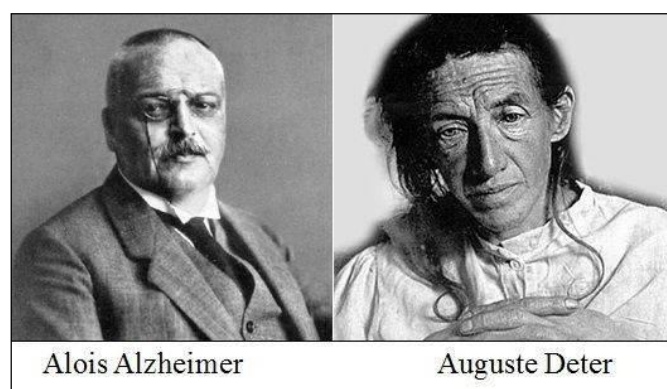
|   |         |
|---|---------|
| D-Résultats 2.....  | 139     |
| a- Matériels et méthodes.....   | 139     |
| 1- Constructions et mutagenèse dirigée.....   | 139     |
| 2- Culture cellulaire et transfection.....  | 139     |
| 3- Immunoempreinte.....   | 140     |
| 4- Activité transcriptionnelle de p53.....  | 140     |
| 5- Analyses statistiques.....   | 140     |
| b- Résultats.....   | 141     |
| 1- Effets de l'abolition de l'activité kinase de Pyk2 sur le métabolisme de $\beta$ APP dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y..... | 141     |
| 2- Dialogue fonctionnel entre Pyk2 et p53.....  | 144     |
| 3- Discussion.....  | 146     |
| <br>10-DISCUSSION ET PERSPECTIVES.....  | <br>148 |
| A-Est-ce que les 7 mutations de SorLA découvertes ont un effet sur la maturation protéolytique de la protéine $\beta$ APP ?.....  | 149     |
| B-Est-ce que la protéine Pyk2 est impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine $\beta$ APP ?.....                    | 150     |
| C-Tous les candidats identifiés par GWAS sont impliqués dans le métabolisme de la protéine $\beta$ APP ?.....                     | 151     |
| D-La MA en 2023 ?.....  | 152     |
| <br>11-ANNEXES – ARTICLES GWAS.....   | <br>152 |
| A-Article 1.....  | 154     |
| B-Article 2.....  | 169     |
| C-Article 3.....  | 181     |

# 1-INTRODUCTION

La MA est une forme de démence qui affecte environ 1.2 millions de personnes en France et 60 millions dans le monde. 140 millions le seront sans doute à l'horizon 2050 ! La cause exacte de cette pathologie est encore inconnue, mais il existe des facteurs de risque connus qui y sont associés, tels que l'âge, les antécédents familiaux et certaines mutations génétiques. *SORL1* et *PTK2B* sont 2 gènes « facteur de risque » associés à une forte probabilité de développer la MA que j'ai étudiés durant ma thèse. Des études ont montré que des mutations dans l'un ou l'autre de ces 2 gènes étaient probablement liés au développement de la pathologie chez l'homme. Dans ce mémoire, en plus de décrire la MA et ses principaux acteurs, je développerai également une partie plus génétique dans laquelle je répertorie les autres facteurs de risque sur lesquels j'ai travaillé avant ma thèse : *ADAM30* et *FERMT2* et j'exposerai mes résultats obtenus sur l'implication de *SORL1* et *PTK2B*.

## 2-LA MALADIE D'ALZHEIMER

La MA a été décrite pour la première fois par Aloïs Alzheimer en 1906 lors de la 37ème conférence des psychiatres allemands à Tübingen (*Figure 1*). Il décrit le comportement anormal de sa patiente, Auguste D., 51 ans, qui présente un délire de jalousie envers son mari, une dégradation de la mémoire et une grande désorientation spatiale et temporelle. L'examen post-mortem du cerveau révélera la présence dans le cortex cérébral de dépôts protéiques et d'enchevêtrements neurofibrillaires.



*Figure 1 : Le Dr. Alzheimer et sa patiente (d'après American Senior Communities)*

### A- Les aspects cliniques :

#### a- Les symptômes de la MA :

La MA est cliniquement caractérisée par le développement progressif d'une démence cognitive où les troubles de la mémoire sont majoritairement présents. Les premières manifestations les plus fréquemment observées chez les malades sont une amnésie légère portant sur des faits récents. Cette amnésie évolue ensuite en une perte de mémoire plus sévère, portant sur des faits plus anciens. Les patients ont également une désorientation spatiale et temporelle, ils ont tendance à se perdre dans des endroits familiers, et peuvent perdre la notion de temps. Les malades ont des troubles du langage (aphasie) et peuvent avoir du mal à s'exprimer, à lire ou à écrire. Ils finissent par ne plus participer aux conversations. Ils ont des troubles gestuels (apraxie), des difficultés à accomplir des tâches quotidiennes, comme se laver ou s'habiller. Ils ne savent plus se servir d'objets familiers malgré des fonctions motrices intactes. Ils ont des troubles de la reconnaissance (agnosie) et sont incapables de reconnaître des objets ou des personnes de leur entourage malgré des fonctions sensorielles intactes. L'absence d'émotion et de motivation (apathie) leur fait perdre toute initiative, ils se referment sur eux-mêmes, se désintéressent de tout, sont indifférents aux émotions ou aux désirs. Ils ont un comportement similaire à un état dépressif. Enfin, les patients ont des troubles de l'humeur et peuvent avoir des idées délirantes, des angoisses inexplicables. Ils se sentent persécutés et se montrent agressifs même envers leurs proches.

L'apparition des différents symptômes est progressive. Elle varie d'une personne à l'autre, mais généralement les malades perdent peu à peu leur autonomie et deviennent dépendants de leur entourage. Les médecins définissent 3 grandes phases dans l'évolution de la MA : la phase asymptomatique (de 10 à 25 ans avant un diagnostic) où les lésions s'installent sans symptôme clinique, certainement en raison de mécanismes de compensation neuronaux (comme l'hyperactivité des neurones restants ou l'hypersensibilité des récepteurs post-synaptiques) ; la phase symptomatique pré-démontielle (de 3 à 5 ans avant un diagnostic) où les symptômes sont légers sans perte d'autonomie et insuffisants pour définir une démence. C'est justement dans cette phase que les médecins identifient les patients MCI (pour Mild Cognitive Impairment). Cette phase correspond à une atteinte concrète des fonctions cognitives chez une personne, mais sans qu'elle soit suffisamment importante pour l'impacter sur les tâches de sa vie quotidienne. Les patients MCI présentent uniquement des troubles cognitifs pré-démontiels. Enfin, la phase symptomatique démentielle au cours de laquelle les troubles mnésiques s'aggravent, ceux du comportement apparaissent (aphasie, apraxie, agnosie et apathie) et le malade perd totalement son autonomie. C'est à ce stade, beaucoup trop tardif, que la démence est avérée et diagnostiquée formellement.

## b- Le diagnostic de la MA :

### 1- Le diagnostic clinique de démence :

Les tests neuropsychologiques, accompagnés de nombreux tests comportementaux, permettent d'identifier un état de démence. Parmi ceux-ci, on trouve l'évaluation cognitive globale, l'évaluation de la mémoire (épreuve de rappel des 5 mots) ou l'évaluation des fonctions exécutives. L'imagerie cérébrale par résonance magnétique (IRM) permet de surveiller l'évolution de l'atrophie cérébrale et de confirmer la démence. En effet, il a été montré une forte corrélation entre les symptômes de démence et la diminution du volume cérébral (Fox et al. 1996 ; C. R. Jack et al. 2000).

### 2- Le diagnostic différentiel :

Même si dans 60% des cas, la démence est associée à la MA, à l'aide d'examens cliniques (scanner, bilan sanguin, ...), le diagnostic différentiel permet d'éliminer certaines causes de démence non liées à la MA comme un accident vasculaire, un trouble thyroïdien ou un déficit vitaminique.

### 3- Le diagnostic certain post-mortem :

Actuellement, le seul moyen de pouvoir prononcer un diagnostic entièrement certain de la MA est de faire une analyse du tissu cérébral. Cependant, prélever du tissu profond dans le cerveau (appelé noyaux de la base) n'est pas faisable sur une personne, de son vivant. C'est pourquoi les seuls critères sont encore aujourd'hui l'observation microscopique post-mortem du cerveau qui révèlent la présence de marqueurs histopathologiques de la MA que sont d'une part les dégénérescences neurofibrillaires (DNF) intracellulaires constituées principalement de la protéine tau (pour tubulin-associated unit), d'autre part, en extracellulaire, les plaques séniles constituées essentiellement du peptide amyloïde  $A\beta$  (*Figure 2*).

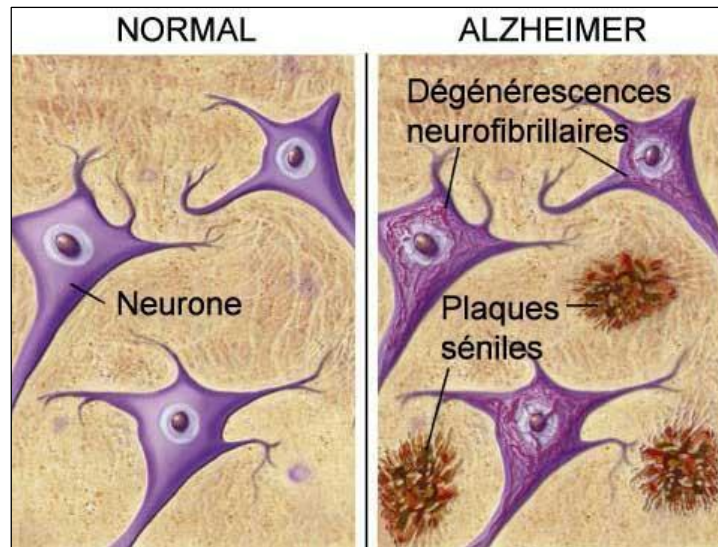


Figure 2 : Les lésions de la maladie d'Alzheimer (d'après Agence France Presse)

L'un des plus grands enjeux de la recherche clinique est la mise au point d'un diagnostic précoce, spécifique et efficace de la MA. Il existe plusieurs approches susceptibles de répondre à cet objectif comme la détection précoce *in vivo* de marqueurs biologiques spécifiques de la MA, la protéine tau, le peptide A $\beta$  ou les marqueurs de la mort neuronale dans le cerveau, le liquide cérébro-spinal (LCS) ou le sang (Andreasen et Blennow 2005 ; Hampel, Lista, et Khachaturian 2012). Les progrès d'imagerie cérébrale et la visualisation précoce des plaques séniles se développent. Une équipe japonaise a visualisé les plaques séniles de souris transgéniques vivantes en leur injectant par voie intraveineuse un traceur amyloïdophile, non toxique et détectable par IRM classique (Higuchi et al. 2005). Une autre technique d'imagerie est la tomographie par émission de positon (PET-scan) qui permet de visualiser et de quantifier un radio-traceur injecté préalablement. Des américains ont testé chez la souris et chez l'homme, un radio-traceur marqué au carbone 11, dérivé de la thioflavine (colorant spécifique des amas amyloïdes, *in vitro*), capable *in vivo* de traverser la barrière hémato-encéphalique et de venir marquer les plaques séniles (Klunk et al. 2004). Enfin, il est possible de coupler aux examens cliniques le dosage de 3 biomarqueurs dans le LCS : la protéine tau totale, la protéine tau hyperphosphorylée et le peptide A $\beta$  1-42 (Albert et al. 2011). Grâce à des techniques d'ELISA (pour Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) commerciales, ces derniers, libérés dans le LCS, sont facilement dosés. Ceci permet de prédire le risque de MA avant même la survenue des signes cliniques. La variation de concentration de ces 3 biomarqueurs est le reflet des conséquences des lésions caractéristiques de la maladie dans le cerveau : une diminution d'A $\beta$  1-42 associée à une augmentation de tau et phospho-tau caractérisent une suspicion de MA (Strozyk et al. 2003 ; Buerger et al. 2006 ; Tapiola et al. 2009).

Ainsi ces biomarqueurs apportent des éléments supplémentaires pour affirmer si un syndrome démentiel ou un MCI est véritablement lié et précurseur d'un processus

physiopathologique de type Alzheimer (R. C. Petersen et al. 1999 ; R. C. Petersen 2004 ; Dubois et al. 2007 ; McKhann et al. 2011). En fonction du niveau de biomarqueurs détectés, 3 stades sont définis : haut, intermédiaire et peu vraisemblable. Ils peuvent se combiner aux diagnostics de MA probable, possible ou MCI.

Une étude a reconstitué sur des dizaines d'années l'évolution des différents biomarqueurs connus, avant et après la survenue des signes cliniques, chez des sujets porteurs de mutations autosomiques dominantes pour la MA (Bateman et al. 2012).

### c- Le traitement actuel de la MA :

Actuellement, en Europe, il n'existe aucun traitement curatif de la MA. Aux Etats-Unis, 2 anticorps monoclonaux ciblant le peptide amyloïde A $\beta$ , responsable des plaques séniles, ont été récemment validé par la FDA (Food and Drug Administration). Il s'agit de l'Aducanumab (autorisé en 2021) et du Lecanemab (autorisé en 2023). L'Aducanumab reste malheureusement interdit en Europe en raison d'avis négatifs (European Medicines Agency 2022) et le Lecanemab doit obtenir l'autorisation de l'Agence européenne du médicament. Ainsi, aujourd'hui encore, les médicaments utilisés ont une efficacité limitée, ils ne sont que symptomatiques, c'est-à-dire qu'ils agissent sur les symptômes et non les causes de la pathologie et ne sont donc pas prescrits systématiquement. Leurs effets indésirables et leurs interactions médicamenteuses en limitent l'usage. En raison d'une efficacité relative sur certains symptômes, qu'ils soient cognitifs ou non, sur une période courte, et sur seulement un tiers des patients, la Haute Autorité de Santé estime que les médicaments de la MA n'ont plus leur place dans la stratégie thérapeutique. C'est pourquoi ils ne sont plus remboursés depuis août 2018.

Les médicaments actuellement sur le marché européen (Donepezil, Galantamine, Rivastigmine et Memantine) atténuent les pertes de mémoire, les dysfonctionnements du langage et du raisonnement. Ils stabilisent les troubles de la maladie en ciblant principalement 2 transmissions synaptiques que sont les transmissions cholinergique et glutamatergique. La transmission cholinergique a pour neurotransmetteur l'acétylcholine qui est libérée au niveau des synapses, se fixe aux récepteurs muscariniques ou nicotiques présents à la surface des membranes post-synaptiques pour transmettre l'influx nerveux. L'acétylcholine libre, non fixée aux récepteurs cholinergiques, est dégradée dans la fente synaptique par l'acétylcholinestérase. Cette transmission cholinergique semble jouer un rôle important dans les fonctions cognitives, et elle est sérieusement affectée précocement chez les patients atteints de la MA (Kasa et Rakonczay 1997), d'où l'intérêt porté aux médicaments capables d'améliorer cette transmission cholinergique dans le traitement de la MA. 3 inhibiteurs d'acétylcholinestérase (Donepezil, Galantamine et Rivastigmine), qui inhibent la dégradation de

l'acétylcholine, sont utilisés dans le traitement de la MA et les agonistes des récepteurs cholinergiques qui améliorent la transmission cholinergique en se substituant à l'acétylcholine sont en cours d'essais cliniques. La transmission glutamatergique a pour neurotransmetteur le glutamate. Il est libéré au niveau des synapses, se fixe aux récepteurs glutamatergiques (AMPA (pour Alpha-Methyl-Propionic Acid) et NMDA (pour N-methyl-D-aspartate)) présents à la surface des membranes post-synaptiques. Une activation brève des récepteurs est bénéfique pour une transmission synaptique normale, mais à l'inverse une activation prolongée ou chronique des récepteurs est associée à une dégénérescence neuronale importante. La stratégie thérapeutique visant la transmission glutamatergique consiste à inhiber l'effet pathogène du glutamate et à limiter la dégénérescence neuronale observée chez les patients atteints de la MA. Un antagoniste non compétitif (Memantine) du récepteur NMDA bloque son canal calcique et inhibe la neurotoxicité du glutamate sans altérer son rôle physiologique nécessaire aux mécanismes mnésiques (apprentissage et mémoire) (Sonkusare, Kaul, et Ramarao 2005).

Chez les patients présentant de l'agressivité entraînant un danger pour eux ou leurs proches, il est aussi possible de prescrire des neuroleptiques (Risperdal) mais ce type de traitement doit rester de courte durée car il augmente le risque de mortalité (Maust et al. 2015).

## **B- Les aspects histologiques :**

Les patients atteints de MA présentent des lésions cérébrales macroscopiques et notamment une importante atrophie cérébrale (atrophie corticale prédominant sur les lobes temporaux internes, tout en épargnant les cortex moteur primaire, sensoriel et visuel) qui se traduit par une dilatation du système ventriculaire et un élargissement des sillons corticaux. Ces lésions peuvent être observées par IRM cérébrale sur patient vivant (*Figure 3*) (Bradford C. Dickerson et Sperling 2009 ; B. C. Dickerson et al. 2011). Le cerveau d'un patient peut perdre jusqu'à 20% de son volume alors que chez une personne normale le volume du cerveau reste constant jusqu'à 50-55 ans puis il diminue d'environ 2% tous les 10 ans.



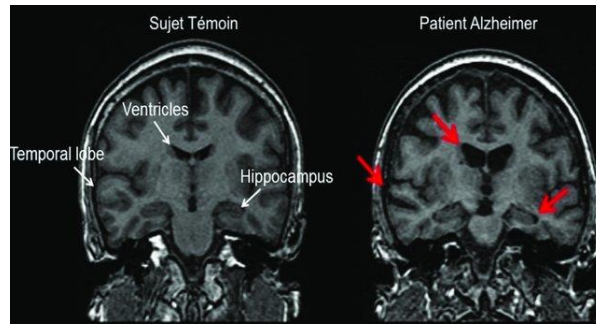


Figure 3 : L'IRM comparative d'un sujet sain et d'un patient Alzheimer (d'après Folly-Adjon, 2019)

Des lésions cérébrales microscopiques sont également observées chez les patients atteints de MA. Elles ont été découvertes pour la première fois par Aloïs Alzheimer après l'analyse post-mortem du cortex cérébral de sa patiente Auguste D. Grâce à une technique d'imprégnation à l'argent, il met en évidence d'une part des dépôts protéiques intracellulaires qui seront plus tard appelées DNF, et d'autre part des dépôts protéiques extracellulaires qui seront baptisées plaques séniles. Mais depuis les découvertes du docteur Alzheimer, la composition des lésions a méticuleusement été disséquée et d'autres altérations neuropathologiques ont été mises en évidence : la perte synaptique, la déplétion sélective du système cholinergique, les lésions vasculaires et chez certains patients, la présence de corps de Lewy (Hansen et al. 1993).

a- Les dégénérescences neurofibrillaires intracellulaires ou DNF :

La première description des DNF par Aloïs Alzheimer décrit des inclusions filamenteuses situées dans le péricaryon des neurones pyramidaux (Figure 4) (Stelzmann, Norman Schnitzlein, et Reed Murtagh 1995).

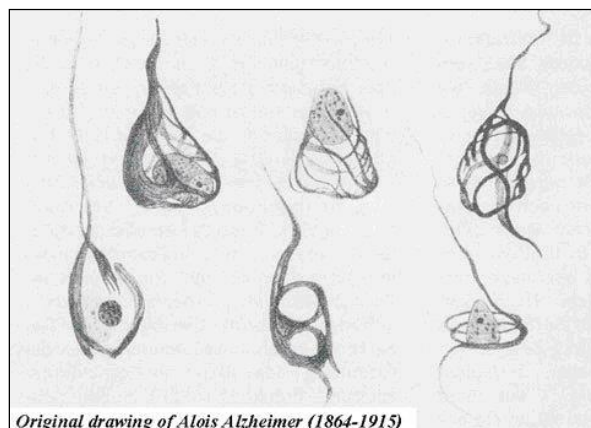


Figure 4 : Les dessins originaux du Dr. Alzheimer (d'après <http://accs.ens-lyon.fr>)

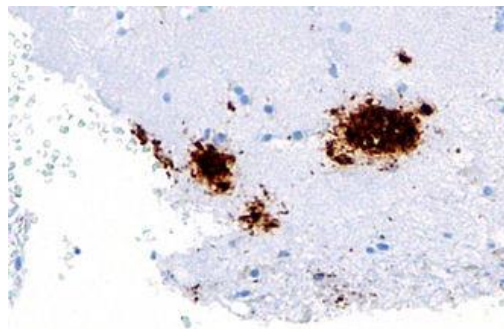
Les DNF sont des dépôts de filaments pathologiques extrêmement insolubles qui s'accumulent dans les corps cellulaires des neurones mais aussi dans leurs prolongements et à la périphérie des plaques amyloïdes. Plusieurs études proposent que la neurotoxicité de tau ne serait pas due qu'aux DNF mais également aux formes hyperphosphorylées solubles (Andorfer et al. 2005 ; Van Der Jeugd et al. 2012 ; Polydoro et al. 2014). L'observation de ces lésions en microscopie électronique a révélé une structure en paire de filaments protéiques appariée en hélice (PHF pour Paired Helical Filaments) de 10 $\mu$ m de diamètre (Kidd 1963 ; S. Sato et al. 2002). Le principal composant de ces dépôts intracellulaires est la protéine tau, décrite comme impliquée dans le dynamisme de la polymérisation et de la stabilisation des microtubules et dans le transport dans les axones. En se liant à la tubuline, tau facilite la polymérisation des microtubules (Avila et al. 2004). Son hyperphosphorylation empêche son ancrage aux microtubules, provoque son agrégation et peut contribuer aux dysfonctionnements pathologiques de la MA (Johnson et Hartigan 1999). La formation des neurofibrilles suit une séquence spatio-temporelle définie (Braak et Braak 1991) qui est corrélée à la progression clinique de la MA. La DNF débute dans le cortex trans-entorhinal, puis évolue vers l'hippocampe, le cortex temporal et enfin le cortex polymodal et unimodal. Au final, toutes les régions du cerveau seront affectées par les DNF. A ce jour, aucune mutation sur le gène de la protéine tau n'a pu être liée à la MA. Cependant, certaines mutations sont responsables de processus neurodégénératifs et du développement de démences (Mike Hutton et al. 1998 ; Spires-Jones et al. 2009), révélant qu'une modification du gène est potentiellement suffisante pour entraîner une neurotoxicité. D'ailleurs l'évolution des DNF corrèle mieux avec l'évolution de la maladie que les plaques séniles (Gómez-Isla et al. 1997 ; Giannakopoulos et al. 2003). Plusieurs travaux ont décrit qu'une plus faible expression de tau serait protectrice contre la toxicité d'A $\beta$  (Rapoport et al. 2002 ; SantaCruz et al. 2005 ; Roberson et al. 2007), alors qu'une surexpression conduirait à une augmentation de toxicité (Sotiropoulos et al. 2008). Les DNF ne sont pas uniquement présentes dans la MA. Elles sont retrouvées dans beaucoup de neuropathies comme le syndrome de Down (ou trisomie 21), la maladie de Pick, la démence fronto-temporale (associée à une maladie de Parkinson et liée au chromosome 17 appelée aussi FTDP-17), la démence pugilistique, la dégénérescence corticobasale, ou encore au cours d'un vieillissement normal. Je ne développerai pas plus cette partie du manuscrit car notre laboratoire étudie plus précisément l'amyloïdogénèse au sens large que la protéine tau.

#### b- Les dépôts amyloïdes extracellulaires :

Les dépôts amyloïdes sont habituellement présents dans l'hippocampe, l'amygdale et certaines régions corticales et sous-corticales. Ils proviennent de l'accumulation et

du dépôt extracellulaire anormal du peptide A $\beta$ , produit physiologique du métabolisme de la protéine précurseur du peptide amyloïde  $\beta$ APP après son clivage par les enzymes  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases. Il existe plusieurs formes de peptides A $\beta$ . Parmi elles, les formes A $\beta$  40 (composées de 40 aa (acides aminés)) sont les plus abondantes mais les formes A $\beta$  42 (composées de 42 aa) sont les plus agrégantes en raison de leur taux de fibrillation et leur insolubilité.

Il existe 2 types de dépôts amyloïdes, présents dans les cerveaux des patients. Il y a d'abord les plaques diffuses qui sont les premières lésions (Mann 1988). Ces plaques s'observent dans le vieillissement normal. Elles sont plus volumineuses, de tailles hétérogènes, irrégulières, mal délimitées et peu denses. Les plaques diffuses sont constituées du peptide A $\beta$  mais leur cœur est uniquement constitué de filaments de la forme A $\beta$  42 d'environ 10 nm. Elles n'ont pas de structure en feuillets  $\beta$  et ne sont pas entourées de neurites dystrophiques alors que les plaques séniles (ou plaques amyloïdes) (*Figure 5*) ont une structure sphérique de 20 à 200  $\mu$ m (Kawai, Cras, et Perry 1992), formées d'un dépôt central dense, ou core, entourés de neurones dystrophiques au niveau de la couronne.



*Figure 5 : Les plaques amyloïdes (d'après <https://institutducerveau-icm.org>)*

Le core de la plaque sénile est une structure hydrophobe en feuillets  $\beta$  dont le composant majeur est également le peptide A $\beta$  sous une forme agrégée. Il s'entoure progressivement d'autres protéines comme l'ApoE (pour Apolipoprotéine E), du cholestérol, des enzymes lysosomales (cathepsine B, cathepsine D) (Namba et al. 1991 ; Dickson 1997 ; Querfurth et LaFerla 2010) mais aussi des synapses dystrophiques et des neurites accompagnés de DNF. Les plaques séniles ont des effets délétères sur le neuropile environnant (pertes synaptiques et neuronales, neurites dystrophiques, recrutement et activation d'astrocytes et de microglie). Autour des plaques séniles, on détecte une gliose réactionnelle témoignant d'une inflammation et d'une réponse immunitaire (Patrick L. McGeer, Rogers, et McGeer 2006). Les plaques séniles, accompagnées de neurites dystrophiques, sont généralement retrouvées chez les patients Alzheimer mais elles ne sont pas spécifiques de la maladie. En effet, on les retrouve au sein d'autres maladies

neurodégénératives comme le syndrome de Down, la démence à corps de Lewy et aussi dans les cerveaux de patients âgés sains (Mann et al. 1990). Cependant, les plaques séniles pourraient n'être qu'un marqueur assez tardif de la pathologie et non la cause de celle-ci car les oligomères d'A $\beta$  libres sont beaucoup plus neurotoxiques (Selkoe 2001 ; Cleary et al. 2005 ; Morley et Farr 2014).

Il semblerait d'ailleurs que les plaques diffuses puissent maturer progressivement en plaques séniles dans le cadre de la MA (Iwatsubo et al. 1995). A $\beta$  42, plus neurotoxique et possédant des propriétés fibrillogéniques importantes, commencerait à former des oligomères puis des fibrilles en feuillet  $\beta$  s'agrégeant auxquels adhère A $\beta$  40. Une fois assemblés en filaments, ils formeraient des plaques séniles sphériques extraneuronales d'environ 50 $\mu$ m.

#### c- Les lésions vasculaires :

Lors de l'examen neuropathologique des patients de la MA, on observe des lésions cérébrovasculaires. Il s'agit généralement d'atteintes de la paroi artérielle, des hémorragies et des lésions d'origine ischémique de la substance blanche (Jellinger et Mitter-Ferstl 2003 ; De La Torre 2004). On parle alors de dépôts amyloïdes vasculaires (ou AAC pour Angiopathie Amyloïde Cérébrale). On retrouve fréquemment une AAC dans un contexte de MA car environ 80% des patients sont affectés à des degrés divers à l'autopsie. Elle devrait être suspectée après une ou plusieurs hémorragies lobaires symptomatiques chez un sujet âgé. L'AAC est composée de la forme A $\beta$  40 qui s'accumule dans l'interstitium entre les cellules musculaires lisses des vaisseaux corticaux et leptoméningés. Des études longitudinales post-mortem ont montré qu'une AAC pouvait contribuer au déclin cognitif de la MA (Greenberg et al. 2004 ; Arvanitakis et al. 2011).

#### d- Les autres lésions :

##### 1- L'atrophie cérébrale :

Grâce à l'IRM anatomique, le profil d'atrophie cérébrale de la MA est dorénavant bien décrit. Cette technique permet d'étudier les modifications de densité et de volume de la substance grise, mettant en évidence une atrophie du lobe temporal interne et plus spécifiquement de l'hippocampe et du cortex entorhinal (Chételat et al. 2003). Les premières IRM anatomiques décrivaient une perte de volume de l'hippocampe d'environ 40% chez les patients par rapport à des individus du même âge en bonne santé (Seab et al. 1988). Depuis, cette atrophie de la région hippocampique et parahippocampique a été largement confirmée (Mega 2000). L'IRM anatomique ne permet d'étudier cependant qu'une région ciblée. C'est pourquoi une autre technique

d'imagerie, la « Voxel Based Morphometry », ou VBM, a été développée pour étudier l'atrophie dans l'ensemble du cerveau de manière reproductible. Cette technique a montré qu'à des stades même légers de la maladie, l'atrophie s'accompagne de l'élargissement des ventricules et touche déjà l'hippocampe et le cortex entorhinal. De façon intéressante et superposable à la progression topographique des DNF, l'atrophie évolue avec la sévérité de la MA, du lobe temporal interne au néocortex.

## 2- La perte neuronale :

Il s'agit du substrat anatomopathologique principal de l'atrophie corticale. Comme pour cette dernière, la progression de la perte neuronale suit celle des DNF. Cependant dans une même région, les pertes neuronales sont plus importantes que les DNF et sont mieux corrélées au déficit cognitif (Gómez-Isla et al. 1996). Cependant, très récemment, une étude remet en question ce phénomène et constate une faible perte neuronale chez des patients atteints d'Alzheimer (Poirel et al. 2018).

## 3- La perte synaptique :

C'est une autre composante de l'atrophie cérébrale des patients atteints de MA. Ici la progression de la perte synaptique correspond à celle de la perte neuronale mais elle peut être plus importante ce qui signifie vraisemblablement que la perte synaptique débute avant la perte neuronale. Les neurones restant sont alors moins bien connectés entre eux. Ainsi la densité synaptique est le marqueur le plus corrélé au déclin cognitif de la MA (DeKosky et Scheff 1990 ; Stephen W. Scheff, DeKosky, et Price 1990 ; Terry et al. 1991 ; Scheff W. Scheff et Price 1993 ; Masliah et al. 1994 ; S. W. Scheff et al. 2007).

## 4- Les réponses gliales :

Les astrocytes et la microglie activés sont associés aux plaques séniles et le peptide A $\beta$  est un important instigateur de la réaction gliale (Itagaki et al. 1989 ; Christian J. Pike, Cummings, et Cotman 1995 ; Vehmas et al. 2003). Une augmentation des astrocytes et de la microglie activés est observée au cours de la maladie même si un plateau précoce des plaques séniles est atteint dans l'isocortex associatif temporal. Une corrélation existe entre ces cellules gliales et le nombre de DNF mais pas avec le nombre de plaques, suggérant que la réaction gliale est également liée à la DNF (Ingelsson et al. 2004 ; Serrano-Pozo et al. 2011).

### 3-LA CASCADE AMYLOÏDE

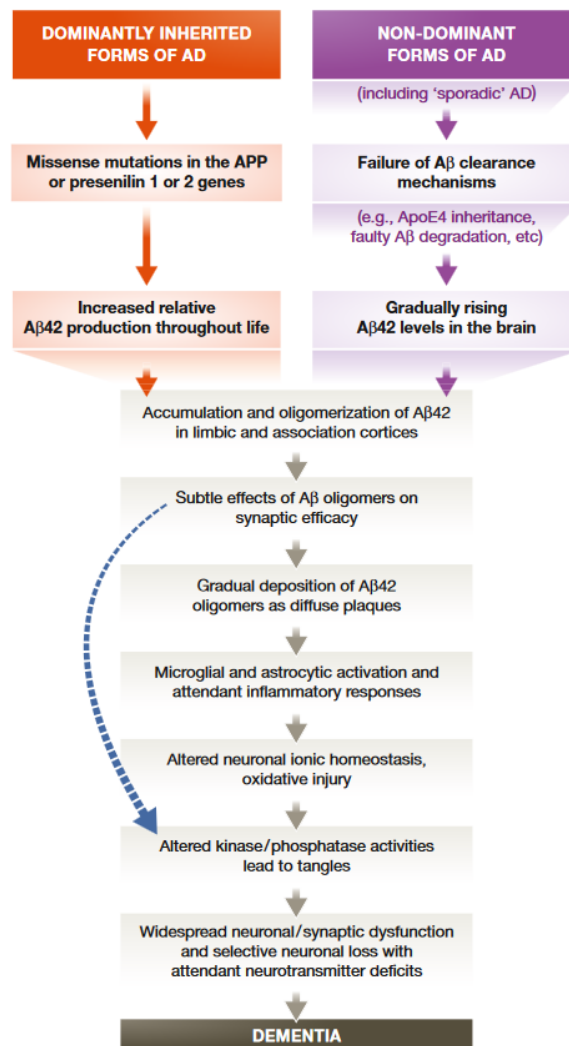


Figure 6 : L'hypothèse de la cascade amyloïde (d'après Selkoe et Hardy, 2016)

L'étiologie de la MA est encore sujette à débat. Si toutes les formes dites familiales ou sporadiques ont globalement les mêmes symptômes cliniques, la présence ou non d'antécédents familiaux, l'âge d'apparition ou sa vitesse de progression segmentent la MA en 2 catégories selon l'âge de début : les formes précoces (entre 30 et 65 ans) et les formes tardives (après 65 ans). Le peptide A $\beta$  est le principal constituant des plaques séniles (Glennner et Wong 1984). Sa production augmente dans les formes familiales de MA (R. E. Tanzi 2012) pour lesquelles les gènes codant pour  $\beta$ APP ou les présénilines, membres du complexe  $\gamma$ -sécrétase, responsable de la libération du peptide A $\beta$ , sont mutés. De même que dans le syndrome de Down pour lequel il y a une duplication du chromosome 21 qui porte notamment le gène codant pour  $\beta$ APP, une démence apparaît très souvent après 40

ans. Ces observations ont conduit les chercheurs à émettre l'hypothèse amyloïde (*Figure 6*) selon laquelle  $A\beta$  et son agrégation sont considérés comme l'un des éléments initiateurs au coeur du processus physiopathologique de la MA (J. A. Hardy et Higgins 1992 ; C. Haass et al. 2012 ; Selkoe et Hardy 2016). Cependant, le lien entre agrégation et apparition de la démence n'est pas clair et implique d'autres altérations conduisant de manière ultime à la mort neuronale.

Selon l'hypothèse amyloïde, le peptide  $A\beta$  s'accumulerait suite à l'altération de sa production, de la nature des  $A\beta$  produits (formes familiales) ou plus généralement (formes sporadiques) par défaut de ses processus de dégradation. Ceci induirait une réponse inflammatoire et des dommages oxydatifs qui précèderaient l'agrégation de tau et la formation des neurofibrilles à l'origine de la DNF. A l'origine, l'hypothèse proposée pour combiner les découvertes sur la MA et pouvoir en déduire un processus physiopathologique repose sur 3 observations :

- L'étude des formes monogéniques à transmission autosomique dominante de la MA a mis en évidence le fait qu'une seule mutation sur les gènes *APP*, préséniline 1 (*PSEN1*) ou préséniline 2 (*PSEN2*) est responsable de formes précoces et agressives de la MA. Ces mutations sont souvent associées à une augmentation de la production du peptide amyloïde et/ou à une modification du rapport des formes  $A\beta_{42}/A\beta_{40}$  (M Hutton 1997 ; John Hardy et Selkoe 2002 ; Walker et al. 2005). Elles favorisent la voie amyloïdogène en augmentant, soit les sites de clivages préférentiels disponibles sur  $\beta$ APP, soit l'activité de la  $\gamma$ -sécrétase et sa disposition à produire l'isoforme  $A\beta_{42}$  insoluble (Corder et al. 1993 ; Sherrington et al. 1995 ; Jankowsky et al. 2004) par rapport à l'isoforme soluble  $A\beta_{40}$ . De plus une mutation de  $\beta$ APP entraînerait une augmentation de tau intracellulaire (S. Moore et al. 2015 ; Takahashi et al. 2015 ; R. E. Bennett et al. 2017).
- Les malades atteints du syndrome de Down développent une pathologie de type Alzheimer avec une démence après l'âge de 40 ans liée au nombre de copies du gène *APP*. Cette hypothèse a initialement été proposée par Hardy et Selkoe en raison de la localisation du gène *APP* sur le chromosome 21. Ainsi, les individus souffrant du syndrome de Down ont une copie supplémentaire du gène *APP* et développent systématiquement une pathologie de type Alzheimer. Il semblerait qu'une production trop grande du peptide  $A\beta$  soit à l'origine de la MA chez ces patients (Selkoe 1991). Cette hypothèse est confortée par le fait que quelques individus porteurs d'une micro-duplication du gène *APP* développent une MA précoce mais pas de syndrome de Down (Rovelet-Lecrux et al. 2006).

- Les plaques séniles semblent neurotoxiques et participeraient à l'apparition des DNF. En effet les mutations sur *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* (vues ci-dessus) entraînent une augmentation de la production, sécrétion et accumulation des plaques séniles dans le parenchyme cérébral. Les propriétés d'agrégation du peptide A $\beta$  favoriseraient son oligomérisation, sa fibrillation et enfin la formation des plaques séniles déclenchant un stress oxydatif important pour les neurones environnants. Ceci conduit alors à l'apparition de dysfonctionnements cellulaires, à l'hyperphosphorylation de tau, donc à la DNF, et enfin à la mort neuronale (J. A. Hardy et Higgins 1992). Des études décrivent le peptide A $\beta$  comme impliqué dans le développement de toutes les lésions typiques de la MA (plaques séniles, DNF, atrophie cérébrale ou perte synaptique). L'hyperphosphorylation anormale de tau peut être due à l'accumulation du peptide A $\beta$ , transmise entre neurones par l'agrégation anormale des protéines tau entre elles (Medina et Avila 2014). De façon intéressante, des neurones qui n'expriment pas la protéine tau sont protégés, *in vitro*, de la mort neuronale induite par A $\beta$  (R. E. Bennett et al. 2017). De plus, les dimères d'A $\beta$  pourraient contribuer à la dépolymérisation du cytosquelette et entraîner une dégénérescence neuronale (W.-H. Zheng et al. 2002).

Cependant, les processus neurodégénératifs résulteraient aussi d'un déséquilibre entre production et clairance du peptide A $\beta$ . Les données génétiques, biochimiques et neuropathologiques mettent l'agrégation d'A $\beta$  au coeur de l'initiation du processus pathogénique de la MA. De plus la DNF est fortement corrélée à un dysfonctionnement neuronal et à la progression de la maladie. Enfin, la phase clinique est caractérisée par une mort neuronale sélective, une perte synaptique et des neurotransmetteurs et une neuroinflammation (David M. Holtzman, Morris, et Goate 2011). Cependant, depuis son élaboration, de nombreux travaux sont venus appuyer ou infirmer cette hypothèse de la cascade amyloïde (Behl et al. 2020) (Fedele 2023).

## A- Une hypothèse incomplète ?

En effet, des études comparatives décrivent l'absence de corrélation entre quantité de plaques séniles et sévérité de la MA. Ce qui en revanche est le cas pour les DNF (Nagy et al. 1996 ; A. Delacourte et al. 1999) même si elles sont tardives et présentes dans toutes les pathologies cérébrales dégénératives. La topographie des plaques séniles et des DNF est inégale dans plusieurs régions du cerveau. Ainsi plus de 80% de la mort neuronale observée est liée à la DNF. La majorité des modèles de cellules et d'animaux qui surexpriment  $\beta$ APP et/ou PS1 mutée, montrent une grande



augmentation de la production et formation des plaques séniles, mais pas de DNF et la perte neuronale est faible. En revanche dans des modèles de primates, l'injection intracérébrale d'A $\beta$  fibrillaire synthétique entraîne l'augmentation de la phosphorylation de tau avec une forte perte neuronale et une prolifération de la microglie, mais seulement chez les macaques rhésus âgés (Geula et al. 1998).

De même que les résultats décourageants des essais cliniques qui visent A $\beta$  ne font que renforcer le doute sur cette hypothèse (John Hardy 2009 ; Karran, Mercken, et Strooper 2011 ; Tayeb et al. 2012 ; De Strooper et Chávez Gutiérrez 2015). C'est pourquoi de nombreux auteurs proposent d'ajouter le rôle central de la pathologie tau dans le processus physiopathologique de la MA (André Delacourte et al. 2002 ; Bretteville et Planel 2008).

Cependant, je vais énumérer ici quelques exemples des nombreuses études qui viennent tout de même appuyer la théorie de la cascade amyloïde :

a- Les mutations du gène de la protéine tau :

De nombreuses mutations sur le gène *MAPT* (pour Microtubule Associated Protein Tau) codant pour la protéine tau ont été décrites, mais jusqu'à présent aucune ne déclenche la MA. Elles sont seulement liées à la démence fronto-temporale (FTDP-17), avec agrégats de tau mais pas de plaques séniles. Ces mutations accélèrent la formation de filaments et génèrent une forte DNF. C'est le cas chez les souris surexprimant tau P301L (Götz et al. 2001). Ces animaux n'ont aucune pathologie de type amyloïde.

b- Les plaques séniles se formeraient avant les DNF :

Chez l'homme, les mutations causales de la MA familiale sur les gènes *APP* et *PSEN* (pour préséniline) entraînent la formation des plaques séniles mais avant le développement des DNF (J. Hardy et al. 1998). De la même manière, chez les souris 3xTgAD surexprimant tau P301L,  $\beta$ APP portant la double mutation suédoise (K670N/M671L) (Mullan et al. 1992) et PS1 mutée en M146V, les DNF apparaissent après les plaques séniles (Oddo et al. 2003). Elles seraient, avec les modifications de tau, un événement distal du développement de la MA.

c- Le peptide A $\beta$  favorise l'hyperphosphorylation de tau :

Malgré le lien entre les 2 lésions principales de la MA, le mécanisme qui lie A $\beta$  à tau est toujours flou. A $\beta$  entrainerait une activation de tau par phosphorylation de Fyn, une protéine kinase. Fyn modulerait alors l'activité du récepteur NMDA par tau. Ainsi, un niveau élevé d'A $\beta$  et de tau hyperphosphorylée conduirait à une diminution de

l'activité du récepteur NMDA, ayant pour conséquence la diminution de la potentialisation à long terme, l'augmentation de l'excitotoxicité et la perturbation de la plasticité synaptique (Iltner et al. 2010 ; Mondragón-Rodríguez et al. 2012 ; Boehm 2013).

Un traitement avec des oligomères d'A $\beta$  42 augmente l'expression de l'AK1 (pour Adénylate Kinase 1) et réduit la phosphorylation de l'AMPK (AMP-activated protein Kinase) ce qui inhibe son activité (Park et al. 2012). L'AMPK dérégulée inhiberait la phosphorylation inhibitrice de GSK3 $\beta$  (pour Glycogen Synthase Kinase 3 bêta) sur tau. Ainsi cette inhibition conduit à son hyperphosphorylation et donc à la DNF (Tomiya et al. 2010). En favorisant l'activité de kinases ciblant tau (comme GSK3 $\beta$ ) A $\beta$  induirait une neuroinflammation. Les cytokines pro-inflammatoires favoriseraient aussi l'hyperphosphorylation de tau (Domingues, Da Cruz E Silva, et Henriques 2017 ; Španić et al. 2019). Enfin, A $\beta$  diminuerait la capacité du protéasome et donc la dégradation de tau altérant le transport axonal et par conséquent la localisation de tau (Takashima et al. 1995 ; Blurton-Jones et Laferla 2006).

La Cdk5 (pour Cyclin-dependent kinase 5) est une sérine/thréonine kinase également responsable de l'hyperphosphorylation de tau (Lund et al. 2001). L'abolition de son expression conduit à une diminution du nombre de DNF observées dans le cerveau de souris C57BL/6 sauvages (Piedrahita et al. 2010). Le traitement par application d'A $\beta$  augmenterait les niveaux de calcium intraneuronale permettant la formation d'un complexe Cdk5/p25 hyperactif. Ce dernier est également responsable de l'hyperphosphorylation anormale de tau et d'une forte neurodégénérescence (Ahlijanian et al. 2000 ; Noble et al. 2003).

#### d- L'injection intracérébrale d'A $\beta$ augmente les DNF :

Chez les souris tau P301L, l'injection de fibrilles synthétiques d'A $\beta$  x-42, par stéréotaxie au niveau de leur cortex somatosensoriel et de leur hippocampe, augmente le nombre de DNF observées d'environ un facteur 5 au niveau de l'amygdale (Götz et al. 2001) par rapport aux souris contrôles. Dans les souris doubles transgéniques, correspondant à un croisement du modèle tau P301L avec le modèle Tg2576 surexprimant  $\beta$ APP portant la double mutation suédoise, on observe une augmentation d'un facteur 7 du nombre de DNF au niveau de l'amygdale, du cortex entorhinal et du bulbe olfactif, par rapport aux souris tau P301L (Lewis et al. 2001).

#### e- Le peptide A $\beta$ déclenche la synaptopathie :

L'atrophie cérébrale et la perte synaptique caractérisent neuropathologiquement la MA. Le peptide A $\beta$  influence la morphologie et le fonctionnement de la synapse (Cleary et al. 2005 ; Snyder et al. 2005). Cette atteinte synaptique est révélée dès les stades précoces, avant l'atrophie et la perte neuronale, majoritairement au niveau des synapses cholinergiques et glutamatergiques (D. H. Small, Mok, et Bornstein 2001). Cette perte synaptique pourrait être à l'origine, lors du stade MCI, de la légère atteinte cognitive observée. Globalement, les souris transgéniques  $\beta$ APP ont une atteinte comportementale liée à la perte synaptique. Cependant cette atteinte apparaît avant les plaques séniles, ce qui discrédite l'hypothèse d'A $\beta$  comme inducteur de la MA. C'est pourquoi des travaux utilisant des anticorps anti-A $\beta$  proposent que ce soient les formes oligomériques solubles du peptide qui seraient impliquées dans la pathologie (Dodart et al. 2002 ; Selkoe 2002 ; Wirths, Multhaup, et Bayer 2004) et les plaques séniles une conséquence plus tardive.

f- La corrélation entre l'allèle *e4* d'*APOE* et l'augmentation des plaques séniles :

L'allèle *e4* de la protéine ApoE étant le principal facteur de risque de la MA (*APOE* sera plus détaillé dans le chapitre - Les facteurs de la MA), cette dernière semble être un déterminant essentiel de la formation des plaques séniles, c'est pourquoi il n'est pas illogique de l'impliquer dans l'hypothèse de la cascade amyloïde. Il existe 3 isoformes d'*APOE*, *e2* (protectrice), *e3* (neutre) et *e4* (facteur de risque). Ainsi, on sait qu'ApoE influence directement ou indirectement la formation des plaques séniles car chez des souris transgéniques un nombre croissant de copies du gène *APOE* humain diminue la quantité de plaques séniles (David M. Holtzman et al. 1999 ; 2000 ; Fagan et al. 2002). Une étude propose qu'ApoE interviendrait d'abord dans la dégradation du peptide amyloïde (Koistinaho et al. 2004). Ainsi des expériences d'expression d'ApoE au niveau du cerveau décrivent une quantité d'ARNm (pour ARN messenger) inversement corrélée à la quantité de plaques séniles (J-C Lambert 2005). De même que des polymorphismes diminuant l'expression du gène *APOE* sont associés à une augmentation de la quantité des plaques séniles et au risque de développer la MA (J-C Lambert et al. 2001 ; Jean-Charles Lambert 2002). Des études d'imagerie cérébrale et neuropathologiques confirment la présence de l'allèle *e4* d'*APOE* corrélée à une augmentation et une accélération des plaques séniles entraînant l'amyloïdogénèse (G. W. Rebeck et al. 1993 ; Reiman et al. 2009 ; Morris et al. 2010).

D'autres études décrivent une corrélation entre *APOE* et la quantité de protéine tau et de peptide A $\beta$  x-42 dans le LCS (Kauwe et al. 2009 ; Cruchaga et al. 2013).

ApoE aurait également un rôle primordial dans le métabolisme de  $\beta$ APP via sa fonction dans le transport du cholestérol (Koudinov et al. 1998), mais aussi au niveau de la prise en charge de la toxicité du peptide A $\beta$  (David M Holtzman 2001),

notamment grâce à ses interactions avec LRP1 (pour Lipoprotein Receptor-related Protein 1) (Verghese et al. 2013). En effet, ApoE se lierait au peptide A $\beta$  neurotoxique agissant ainsi sur sa clairance et son agrégation (J. Kim, Basak, et Holtzman 2009 ; Castellano et al. 2011).

ApoE *e4* favoriserait ou provoquerait une altération de la croissance de l'arborisation neuritique (Nathan et al. 1994), augmenterait le stress oxydant (Miyata et Smith 1996), favoriserait l'hyperphosphorylation de tau (W J Strittmatter et al. 1994), exercerait une toxicité propre via les produits de son métabolisme (Crutcher et al. 1994), ou provoquerait une altération des fonctions mitochondriales (Gibson et al. 2000).

#### g- Une mutation protectrice sur le gène de $\beta$ APP :

Il y a une dizaine d'années, une mutation (A673T) a été découverte sur le gène de  $\beta$ APP. Cette dernière est décrite comme protectrice contre le développement de la MA (Jonsson et al. 2012). Elle diminuerait le clivage par la  $\beta$ -sécrétase (BACE1, qui sera décrite dans le chapitre dédié à la protéine  $\beta$ APP) de  $\beta$ APP sans modifier l'affinité de l'enzyme, réduisant par conséquent la production du peptide A $\beta$ , en particulier A $\beta$  42 (J. A. Maloney et al. 2014).

L'hypothèse de la cascade amyloïde a été émise à partir de travaux effectués uniquement sur les formes familiales à transmission autosomique dominante de la MA, c'est-à-dire des processus physiopathologiques provenant des seules mutations sur le gène de  $\beta$ APP ou des présénilines 1 et 2. Si l'hypothèse de la cascade amyloïde est valable pour 1% des cas de MA (1% des cas sont familiaux), qu'en est-il pour 99% des autres issus des formes sporadiques ? C'est pourquoi l'étude de ces dernières, plus tardives, après 65 ans, et issues de l'association de facteurs génétiques et de facteurs environnementaux, est particulièrement primordiale pour comprendre le processus physiopathologique de cette maladie complexe (Pierre Dourlen et al. 2019).

Cependant, en se basant sur les résultats qui soulignent une éventuelle hypothèse de la cascade amyloïde des approches thérapeutiques ont été développées dans le but de réduire l'accumulation du peptide A $\beta$  dans le cerveau. Ces essais cliniques sont surtout basés sur des immunisations dites passives ou actives. Les immunisations passives correspondent à l'injection d'anticorps monoclonaux anti-A $\beta$  et les immunisations actives à l'injection d'antigènes pour le peptide A $\beta$ , stimulant la réponse immunologique.

Malheureusement certains chercheurs ont suggéré que l'échec de ces essais (Panza et al. 2019) remettait en question l'hypothèse même de la cascade amyloïde. Cependant, certaines publications tentent d'expliquer ce phénomène par le fait que ces traitements sont donnés trop tardivement aux patients chez lesquels le

processus physiopathologique est déjà installé (Modrego et Lobo 2019). En plus, certains sujets sains ont des plaques amyloïdes (environ 30%) sans jamais développer la MA (Iaccarino et al. 2018) suggérant qu'A $\beta$  ne suffirait pas pour déclencher la maladie (Herrup 2015). D'autre part, A $\beta$  neurotoxique entraîne la perte synaptique (Mairet-Coello et al. 2013) mais peu ou pas de neurodégénération (Clifford R. Jack et Holtzman 2013 ; Bloom 2014).

Finalement, alors que l'hypothèse de la cascade amyloïde, dans un premier temps, était décrite de façon très linéaire, un nouveau modèle plus intégratif est présenté. Il s'agit d'associer les pathologies amyloïde et tau qui interagiraient plus précocement et à différents niveaux au cours du développement de la MA pour conduire ensemble à la démence (Pereira et al. 2019 ; King-Robson et al. 2021 ; Mattsson-Carlgren et al. 2021).

## 4-LA PROTEINE $\beta$ APP ET SA MATURATION PROTEOLYTIQUE

Le peptide A $\beta$  provient du métabolisme de la protéine  $\beta$ APP (Kang et al. 1987 ; De Strooper 2010), une glycoprotéine transmembranaire de type I d'environ 100 kDa contenant 3 à 5 domaines en fonction de l'isoforme étudiée. En effet,  $\beta$ APP est issue d'un gène porté par le chromosome 21 et codant pour 4 isoformes essentiellement exprimées dans le système nerveux central (SNC) :  $\beta$ APP 695,  $\beta$ APP 714,  $\beta$ APP 751 et  $\beta$ APP 770 (Kitaguchi et al. 1988 ; Golde et al. 1990 ; Kang et Müller-Hill 1990). Ces 4 isoformes proviennent d'un épissage alternatif différent en fonction du type cellulaire. Ainsi la forme la plus longue et la plus ubiquitaire est la forme  $\beta$ APP 770. Son expression, et celle de  $\beta$ APP 714, est essentiellement astrocytaire et microgliale (Seigo Tanaka et al. 1988). Les formes  $\beta$ APP 695 et  $\beta$ APP 751 sont neuronales mais seule la forme  $\beta$ APP 695 est fortement exprimée dans les neurones (S. Tanaka et al. 1989). Toutes ces isoformes contiennent 3 domaines : un grand domaine N-terminal (N-ter) extracellulaire ou luminal, un domaine transmembranaire hydrophobe et un petit domaine C-terminal (C-ter) intracellulaire cytosolique (*Figure 7*).

La forme  $\beta$ APP 770 possède 2 domaines de plus, un domaine KPI (pour Kunitz Protease Inhibitor) et un domaine OX2 (qui présente une homologie avec le marqueur microglial OX2) (G. William Rebeck et al. 2001). En revanche, les formes  $\beta$ APP 714 et 751 ne portent pas les domaines OX2 et KPI (Selkoe et al. 1988 ; Gralle et Ferreira 2007) alors que  $\beta$ APP 695 ne possède aucun de ces domaines. Cependant, même si ces isoformes sont différentes, elles possèdent toutes en C-ter la séquence protéique qui correspond au peptide A $\beta$ .

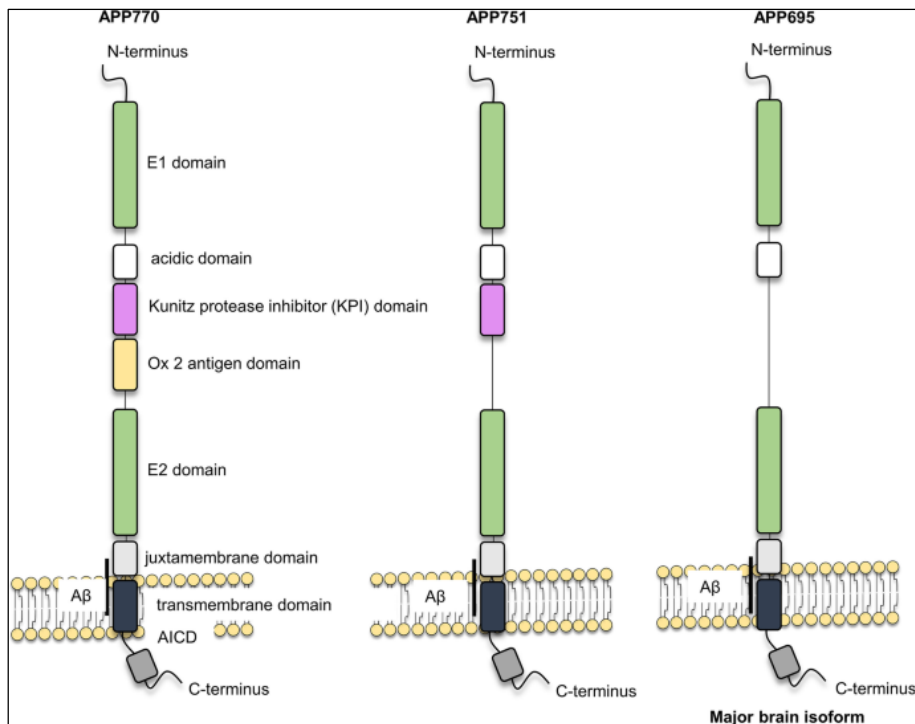


Figure 7 : La structure de 3 isoformes de la protéine  $\beta$ APP (d'après Delpont et Hewer 2022)

Le gène de la protéine  $\beta$ APP est exprimé dans le cerveau mais aussi dans d'autres tissus comme le cœur, le foie, l'intestin, le muscle, la peau, le poumon, la rate, le rein, le thymus et le tissu adipeux (Puig et Combs 2013). Dans les neurones, la protéine  $\beta$ APP est surtout exprimée dans les neurites, c'est-à-dire axones et dendrites, à proximité des synapses (Schubert et al. 1991). Dans la cellule, elle se retrouve dans la membrane cellulaire mais aussi dans les membranes du RE (pour Réticulum Endoplasmique), de l'appareil de Golgi et de certaines vésicules (Verbeek et al. 2002). On détecte son expression très tôt dans l'embryogenèse des souris, ce qui sous-entend un rôle primordial dans le développement (Ott et Bullock 2001). Des études décrivent l'importance du gène de  $\beta$ APP chez le poisson zèbre dans l'organisation de la structure embryonnaire (Joshi et al. 2009). La fonction de  $\beta$ APP est cependant mal connue.

La protéine  $\beta$ APP fait partie d'une famille de protéines très conservées au cours de l'évolution. Il y a APL-1 chez *C. elegans*, APPL chez la drosophile et des homologues APLP1 et APLP2 (pour APP-Like Proteins) chez les mammifères. Les APLP sont des protéines transmembranaires de type I, comme  $\beta$ APP avec laquelle elles partagent des fonctions communes (Chasseigneaux et Allinquant 2012 ; Lazarov et Demars 2012 ; Muller et Zheng 2012). Cependant elles ne possèdent pas la séquence du peptide  $A\beta$  et sont donc incapables de le produire. En revanche, les APLP sont clivées par les mêmes sécrétases que la protéine  $\beta$ APP ce qui conduit à la libération du domaine C-ter intracellulaire (nommé ALID1/ALID2 (pour APP-Like Intracellular Domain) pour les APLP ou AICD (pour Amyloid precursor protein IntraCellular

Domain) pour  $\beta$ APP). Ces derniers auraient un rôle dans la signalisation cellulaire (Scheinfeld et al. 2002 ; Y. Xu et al. 2007 ; Bukhari et al. 2017). L'APLP1 compte 650 aa contre 763 pour APLP2. En effet l'APLP2 possède en plus un domaine KPI, vu ci-dessus.

Les souris invalidées pour le gène codant pour la protéine  $\beta$ APP ou KO (pour Knock-Out) APP sont viables mais ont des altérations globales mineures comme la perte de poids et de masse cérébrale (Magara et al. 1999), une activité locomotrice affaiblie, des altérations du fonctionnement neuronal, une atteinte des axones (Goldstein 2012) et des déficits neuronaux liés à l'âge, c'est-à-dire des perturbations de la morphologie des neurones, de la plasticité synaptique et d'un point de vue comportemental des défauts d'apprentissage et de mémoire (Dawson et al. 1999 ; Seabrook et Rosahl 1999 ; Southam et al. 2019). Les neurones des souris KO APP ont aussi une dynamique et un remodelage des épines dendritiques perturbés en plus de la potentialisation à long terme (LTP) (C. Zou et al. 2016 ; Müller, Deller, et Korte 2017).

Ces altérations globalement mineures peuvent s'expliquer par l'existence des gènes APLP1 et APLP2, très certainement capables de compenser le déficit en  $\beta$ APP. En effet, une délétion de  $\beta$ APP et APLP1 n'est pas létale. Elle ne présente que de légères répercussions au niveau somatique ou comportemental in vivo. Au contraire, l'absence d'APLP2 seule ou avec  $\beta$ APP est létale au stade embryonnaire (Herms et al. 2004 ; Anliker et Müller 2006 ; K. Han, Müller, et Hülsmann 2017).

Dans des conditions pathologiques,  $\beta$ APP est phosphorylée par Cdk5 sur son résidu thréonine 668, ce qui perturbe sa conformation et limite son interaction avec ses différents partenaires, notamment Fe65 (ou APBB1 pour Amyloid-beta A4 Precursor protein-Binding family B member 1). Le métabolisme de  $\beta$ APP se voit donc perturbé, ce qui entraîne son accumulation dans les endosomes et par conséquent la dégénérescence des neurones (Muresan et Muresan 2007).

## A- Les fonctions physiologiques de $\beta$ APP :

Ces dernières sont complexes à étudier en raison non seulement de l'existence des protéines homologues APLP1 et APLP2 qui compensent les fonctions essentielles de  $\beta$ APP mais aussi l'existence de nombreux fragments biologiquement actifs qui sont issus de sa dégradation et qui peuvent contribuer à des phénotypes distincts. La protéine  $\beta$ APP possède potentiellement de nombreuses fonctions physiologiques lui permettant d'intervenir au cours du développement cérébral, dans la plasticité synaptique ou la mémorisation. La protéine est transportée de façon dépendante de Rab11 (pour Ras-related protein 11) vers les axones et les dendrites par un mécanisme de transcytose (Woodruff et al. 2016 ; J. Z. A. Tan et Gleeson 2019). Elle

y exercera un rôle neurotrophique par sa contribution à l'adhésion cellulaire. En effet, la protéine  $\beta$ APP peut lier le collagène, la laminine ou la reelin qui sont des composés de la matrice extracellulaire (MEC) (Hoe et al. 2009) et ainsi jouer un rôle dans l'adhésion cellule-matrice. La séquence RHDS de  $\beta$ APP du côté C-ter se lierait à des récepteurs de la surface cellulaire. Son interaction avec des protéoglycans de la MEC lui permettrait de se présenter selon une certaine conformation pour se lier aux récepteurs de la surface cellulaire stimulant la croissance axonale (D. H. Small et al. 1999). Au cours du développement cérébral, on retrouve une forte concentration de  $\beta$ APP dans les cônes de croissance (T. Yamazaki, Selkoe, et Koo 1995 ; Beher et al. 1999) suggérant son implication dans la migration et la croissance des neurites (Perez et al. 1997), notamment à l'aide de la séquence REMRS présente dans son domaine extracellulaire E2.

$\beta$ APP formerait aussi des dimères en *cis* à la surface cellulaire favorisant les adhésions homo- et hétérotypiques (Soba et al. 2005). Cette dimérisation et sa liaison avec des partenaires de la MEC module son métabolisme et son clivage par les différentes sécrétases, décrites plus bas.

Les fragments issus de  $\beta$ APP comme  $sAPP_{\alpha}$  (pour soluble  $APP_{\alpha}$ ),  $sAPP_{\beta}$  et  $A_{\beta}$ , également décrits plus bas, interagiraient avec lui pour moduler la genèse des neurites et d'autres fonctions synaptiques. Ainsi, un rôle de  $\beta$ APP dans la synaptogénèse et la stabilisation des synapses est possible. À la surface cellulaire, la protéine serait impliquée dans les mécanismes d'adhésion synaptique primordiaux pendant la synaptogénèse et dans les processus de stabilisation des synapses à l'âge adulte. En effet, l'expression de  $\beta$ APP augmente au cours la synaptogénèse (Sosa et al. 2017).

Parmi ses nombreux partenaires,  $\beta$ APP interagit avec la protéine Fe65 en intracellulaire dans les cônes de croissance. Fe65 qui régule le trafic et le clivage protéolytique de  $\beta$ APP, va former avec lui un complexe qui régule aussi la motilité de ces cônes (Sabo et al. 2003). La protéine  $\beta$ APP peut aussi interagir avec la sous-unité  $\alpha$  de la protéine Go ce qui sous-entend qu'il fonctionnerait comme un récepteur couplé aux protéines G non conventionnel.  $\beta$ APP pourrait, de façon dépendante à l'activation de  $Go_{\alpha}$ , conduire à la rétractation des filopodes du cône de croissance et réduire leur exploration (Ramaker et Copenhaver 2017).

Une étude a décrit une diminution de l'expression de  $\beta$ APP associée à une diminution de la croissance axonale alors qu'une surexpression augmente la taille des cônes de croissance mais ne module pas la croissance axonale. Chez les souris KO APP, on peut observer une diminution du nombre de filopodes dans le cône de croissance. Au contraire, il augmente dans les neurones de souris surexprimant  $\beta$ APP humaine. Enfin, le niveau d'expression de  $\beta$ APP modifie l'adhésion des cônes de croissance (Sosa et al. 2013).



Après la naissance,  $\beta$ APP aurait un rôle dans la formation et le maintien des synapses (Tyan et al. 2012). La protéine régulerait la plasticité synaptique en régulant le taux de D-sérine (agoniste des récepteurs NMDA) libéré par les astrocytes. Chez les souris KO APP, ce taux extracellulaire est réduit par rapport aux souris sauvages abolissant l'induction de la LTP (Montagna, Dorostkar, et Herms 2017).

Après la maturation neuronale, la protéine  $\beta$ APP est exprimée dans les compartiments pré- et post-synaptiques. Au niveau post-synaptique, la protéine serait nécessaire pour conduire à l'expression et à la fonction de protéines pré-synaptiques (Z. Wang et al. 2009). Cependant, la participation de  $\beta$ APP dans les 2 compartiments pré- et/ou post-synaptiques pourrait être différente selon le type de synapses. Mais, une fois à la synapse,  $\beta$ APP se dimérise en *trans* entre les compartiments pré- et post-synaptiques, par l'intermédiaire de ses 2 domaines extracellulaires, E1 principalement et E2, grâce à un motif GxxxG. Cette dimérisation régule l'adhésion synaptique et la stabilisation entre les compartiments pré- et post-synaptiques. Le clivage de  $\beta$ APP réduit sa *trans* dimérisation, l'adhésion cellulaire et la synaptogenèse. En revanche, en inhibant son clivage, on favorise son accumulation à la surface des cellules, favorisant l'adhésion entre les cellules (Stahl et al. 2014). Le domaine intracellulaire de  $\beta$ APP aurait également un rôle dans la synaptogenèse. En effet, via ce domaine, la protéine peut interagir avec Mint1 (ou APBA1 pour APP Binding family A member 1) liant à son tour CASK (pour Calcium/calmodulin dependent Serine protein Kinase). Ce complexe aurait un rôle dans la mise en place du compartiment pré-synaptique. Des souris transgéniques avec une forme tronquée en C-ter de  $\beta$ APP, ont des perturbations dans l'induction et le maintien de la LTP et dans la plasticité synaptique. Ces perturbations, associées à des défauts de mémoire et du comportement indiquent des dysfonctions de l'hippocampe. Ainsi, le domaine intracellulaire de  $\beta$ APP serait nécessaire pour ces mécanismes en se liant avec d'autres partenaires grâce à un motif YENPTY au niveau C-ter. Ce motif est connu dans l'internalisation de  $\beta$ APP, régulant son métabolisme. Chez ces souris exprimant la protéine  $\beta$ APP tronquée en C-ter, cette dernière est moins recyclée au niveau des endosomes et donc plus exprimée à la surface cellulaire. Le clivage de  $\beta$ APP serait préférentiellement effectué par l' $\alpha$ -sécrétase (voir - La maturation physiologique de la protéine  $\beta$ APP), diminuant son clivage par la  $\beta$ -sécrétase (voir - La maturation physiologique de la protéine  $\beta$ APP) et réduisant ainsi la production de peptide A $\beta$  (Klevanski et al. 2015).

## B- La maturation physiologique de la protéine $\beta$ APP :

$\beta$ APP doit subir une série de modifications post-traductionnelles qui lui sont essentielles. Dans la voie de sécrétion dite « classique » (RE, appareil de Golgi, vésicules de sécrétions),  $\beta$ APP perd son peptide signal de 17 aa, puis est phosphorylée, N- et O-glycosylée, sulfatée (A. Weidemann et al. 1989 ; Sambamurti, Greig, et Lahiri 2002), sialylée pour acquérir finalement sa structure tridimensionnelle. La majorité de  $\beta$ APP cellulaire est, sous sa forme mature, ancrée aux membranes. Par la suite, 2 voies métaboliques principales sont possibles pour la protéine membranaire. Ces 2 voies impliquent l'action successive de 3 activités enzymatiques (M. P. Mattson 1997 ; Nunan et Small 2002 ; Y. Ling, Morgan, et Kalsheker 2003): la voie non-amyloïdogène faisant intervenir l' $\alpha$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase, et la voie amyloïdogène impliquant la  $\beta$ -sécrétase et la  $\gamma$ -sécrétase.

a- La voie non-amyloïdogène :

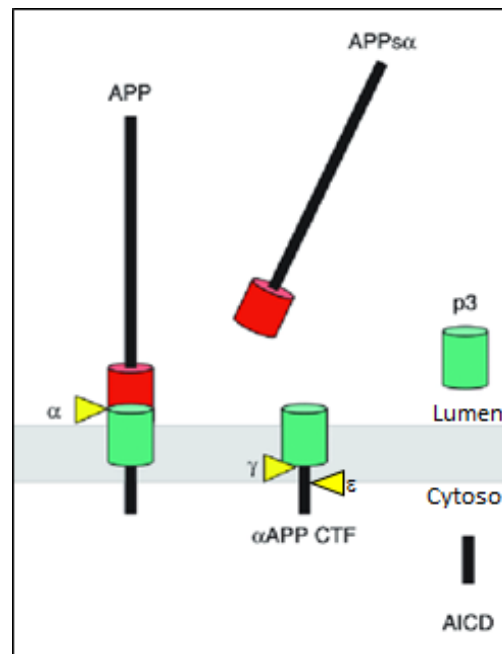


Figure 8 : La voie non amyloïdogène (d'après C. Haass et al. 2012)

Lorsque la protéine  $\beta$ APP atteint la membrane plasmique, elle subit un clivage protéolytique de nature non-amyloïdogène (Figure 8). Ce dernier implique l'action d'une activité enzymatique nommée  $\alpha$ -sécrétase, localisée à la membrane plasmique. Dans cette voie de protéolyse,  $\beta$ APP est clivée par l' $\alpha$ -sécrétase à l'intérieur de la séquence du peptide A $\beta$ . En effet,  $\beta$ APP 695 est clivée entre la lysine 613 et la leucine 614, ce qui correspond aux aa 16 et 17 du peptide A $\beta$  (Esch et al. 1990 ; R. Wang et al. 1991 ; De Strooper, Vassar, et Golde 2010). Ainsi cette voie prévient la formation du peptide A $\beta$  et est donc « non-amyloïdogène ». Elle produit un fragment N-ter de 120 kDa, sAPP $\alpha$ , et un fragment C-ter d'environ 10 kDa, C83

ou p10 qui reste ancré à la membrane ou est internalisé dans les endosomes et lysosomes. Le fragment C83 subit alors un clivage intramembranaire par la  $\gamma$ -sécrétase, décrite plus bas, libérant le peptide p3 (la séquence comprise entre les résidus 17 et 40/42 du peptide A $\beta$ ). Les clivages intramembranaires de C83 au site  $\gamma$ - et  $\varepsilon$ -sécrétase libèrent les fragments cytosoliques AICD C50, C57 et C59 pouvant être transloqués dans le noyau pour jouer un rôle de facteur de transcription (Pardossi-Piquard et Checler 2012). Le clivage  $\alpha$ -sécrétase intervient surtout au niveau des compartiments tardifs de l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique, mais une fraction de  $\beta$ APP échappe à cette protéolyse et sera internalisée dans les endosomes. Ces différentes localisations de production de sAPP $\alpha$ , dans des compartiments cellulaires avec des propriétés physico-chimiques qui leur sont propres, sous-entendent l'existence d'au moins 2 protéases différentes, l'une intracellulaire et l'autre à la membrane plasmique (Checler et al. 2002).

### 1- L' $\alpha$ -sécrétase :

L'activité  $\alpha$ -sécrétase clive principalement à la membrane plasmique mais peut aussi agir au niveau du réseau transgolgien (TGN pour Trans-Golgi Network). Le clivage de la protéine  $\beta$ APP par l' $\alpha$ -sécrétase aurait un rôle protecteur, grâce à la coupure dans la séquence du peptide A $\beta$  mais aussi parce que le sAPP $\alpha$  libéré pourrait avoir un effet neuroprotecteur en stimulant la croissance neuronale (Ring et al. 2007). On distingue 2 voies  $\alpha$ -sécrétases différentes : la voie sécrétoire constitutive, où la protéine  $\beta$ APP est clivée par l' $\alpha$ -sécrétase générant sAPP $\alpha$  sécrété dans le milieu extracellulaire et la voie de sécrétion régulée, où  $\beta$ APP est clivée par l' $\alpha$ -sécrétase sous le contrôle de la protéine Kinase C (PKC). En stimulant son activité, on augmente celle de l' $\alpha$ -sécrétase, conduisant à l'augmentation du sAPP $\alpha$  et favorisant la baisse de la production du peptide A $\beta$  (A. Y. Hung et al. 1993 ; Vingtdeux et Marambaud 2012).

Les enzymes ayant une activité  $\alpha$ -sécrétase sont des métalloprotéases à zinc de la famille des ADAM (pour A Disintegrin And Metalloprotease) (Arribas et al. 1996 ; Parvathy et al. 1997 ; Asai et al. 2003). 3 ont été proposées : ADAM9, ADAM10 et TACE (pour Tumor necrosis factor-alpha Converting Enzyme)/ADAM17.

Les protéases impliquées dans l'activité  $\alpha$ -sécrétase ont d'abord été identifiées par des études pharmacologiques couplées à de la biologie cellulaire permettant de déterminer qu'elles étaient les métalloprotéases dont le site catalytique est situé sur la face externe de la membrane plasmique. Par la suite, 3 membres des ADAM, ADAM9, ADAM10 et TACE/ADAM17, ont été décrits comme capables d'induire une coupure de  $\beta$ APP au site  $\alpha$ -sécrétase lorsqu'elles sont surexprimées dans des cellules (Joseph D. Buxbaum et al. 1998 ; Koike et al. 1999 ; Lammich et al. 1999). Depuis, on sait qu'ADAM9 joue sur la maturation d'ADAM10 mais n'agit pas

directement sur le clivage  $\alpha$ -sécrétase (Cissé et al. 2005). En effet en surexprimant ADAM9 dans des cellules dépourvues d'ADAM10, il n'y a pas d'augmentation de la production de sAPP $\alpha$ . Par conséquent, 2  $\alpha$ -sécrétases agissant directement sur la protéine  $\beta$ APP ont été définies : ADAM10 qui est plutôt responsable d'une voie constitutive et TACE/ADAM17 principalement impliquée dans la voie régulée et modulable par phosphorylation. Les protéases ADAM9, ADAM10 et TACE/ADAM17 sont aussi responsables d'autres clivages de nombreux substrats confirmant leur rôle dans diverses fonctions physiologiques. La voie de maturation non-amyloïdogène est largement majoritaire puisqu'en condition physiologique, elle clive près de 90% de  $\beta$ APP. Les 10% restant entrent dans la voie amyloïdogène où, dans les formes sporadiques de MA, l'A $\beta$  40 représente environ 90% du total de peptide amyloïde produit contre un peu plus de 10% pour l'A $\beta$  42 (Gouras et al. 2000).

- ADAM9 (ou Meltrine  $\gamma$ )

Contrairement à ADAM10 et TACE/ADAM17, ADAM9 n'est pas capable de cliver un peptide synthétique mimant le site de clivage  $\alpha$ -sécrétase sur  $\beta$ APP (Koike et al. 1999). C'est pourquoi ADAM9 est exclu par de nombreux auteurs du groupe des  $\alpha$ -sécrétases, ne parlant que d'ADAM10 et TACE/ADAM17. Cependant, il a été montré qu'ADAM9 cliverait  $\beta$ APP entre l'histidine 14 et la glutamine 15, non pas entre la lysine 16 et la leucine 17 (Endres et al. 2003). Un traitement à l'ester de phorbol entraîne une phosphorylation du domaine C-ter d'ADAM9 mais ne modifie pas son activité (Roghani et al. 1999). Plus qu'un clivage direct sur  $\beta$ APP, ADAM9 interviendrait dans le clivage activateur d'ADAM10 jouant indirectement sur le clivage de  $\beta$ APP (Tousseyn et al. 2009). On sait qu'ADAM10 est la protéase majoritaire qui porte l'activité  $\alpha$ -sécrétase (Jorissen et al. 2010 ; Kuhn et al. 2010) mais l'on ne peut pas exclure que d'autres désintégrines aient un rôle important pour l'activité  $\alpha$ -sécrétase. En effet, ADAM9 et TACE/ADAM17 auraient un rôle dans l'activité  $\alpha$ -sécrétase dans la voie de sécrétion régulée (Lopez-Perez et al. 2001). De même que d'autres ADAM, comme ADAM8 ou ADAM19, pourraient aussi influencer l'activité  $\alpha$ -sécrétase (Naus et al. 2006 ; Tanabe et al. 2007).

- ADAM 10

Aussi appelée KUZ (pour Kuzbanian), ADAM10 clive le peptide synthétique qui mime le site de clivage  $\alpha$ -sécrétase de  $\beta$ APP (Lammich et al. 1999). De plus, la surexpression d'ADAM10 dans des cellules HEK-293 (pour Human Embryonic Kidney 293) accroît l'activité  $\alpha$ -sécrétase dépendante de la voie de sécrétion constitutive, mais aussi régulée, conduisant à l'augmentation de la production de sAPP $\alpha$ . Au contraire, on observe une diminution du clivage de type  $\alpha$ -sécrétase sur  $\beta$ APP suite à l'extinction d'ADAM10 ce qui signifie qu'elle pourrait être essentiellement impliquée dans la voie de sécrétion constitutive (Jorissen et al. 2010

; Kuhn et al. 2010). Contrairement à TACE/ADAM17, ADAM10 est fortement exprimée chez l'humain dans les neurones corticaux de la même façon que  $\beta$ APP ((Howard et al. 1996 ; H.-G. Bernstein et al. 2003). Son niveau d'expression est réduit chez les patients Alzheimer (Colciaghi et al. 2002).

- TACE/ADAM17

La première protéase identifiée comme portant une activité  $\alpha$ -sécrétase fut ADAM17, également appelée TACE ((Black et al. 1997 ; Moss et al. 1997). Elle est décrite comme convertissant le pro-TNF en cytokine pro-inflammatoire de 26 kDa (Edwards, Handsley, et Pennington 2008). Chez des souris invalidées (KO) pour la protéine TACE, on observe une diminution de sAPP $\alpha$ , démontrant que cette enzyme pourrait cliver  $\beta$ APP. Son activité semble régulée par PKC, elle serait donc impliquée dans la voie de sécrétion régulée. In vitro, TACE/ADAM17 clive le peptide synthétique qui mime le site de clivage  $\alpha$ -sécrétase de  $\beta$ APP (Joseph D. Buxbaum et al. 1998). Néanmoins, TACE pourrait avoir aussi un faible impact sur le clivage constitutif (Slack, Ma, et Seah 2001). Même si TACE/ADAM17 pourrait contribuer à la production de sAPP $\alpha$  dans la voie constitutive, la majorité des études décrivent son activité  $\alpha$ -sécrétase dépendante essentiellement de la régulation par PKC, c'est-à-dire la voie de sécrétion régulée (Blacker et al. 2002 ; Kojro et al. 2006). Chez l'homme, TACE/ADAM17 est essentiellement exprimée au niveau des neurones pyramidaux de la couche granuleuse de l'hippocampe mais aussi dans les neurones pyramidaux du cortex cérébral. On retrouve une colocalisation avec les plaques séniles chez les patients Alzheimer mais sans modification de son expression (Skovronsky et al. 2001).

Pour conclure cette partie, il faut savoir que  $\beta$ APP est préférentiellement clivée par l' $\alpha$ -sécrétase (Andreas Weidemann et al. 1999). Au niveau cérébral, une augmentation de l'activité  $\alpha$ -sécrétase entraîne une diminution de la production du peptide A $\beta$  (Skovronsky et al. 2000). C'est pourquoi réduire la formation des plaques séniles en augmentant l'activité  $\alpha$ -sécrétase serait une piste thérapeutique. Malheureusement,  $\beta$ APP n'est pas le seul substrat des protéines ADAM. En effet la N-Cadhérine (Kohutek et al. 2009), le TGF- $\alpha$  (pour Transforming Growth Factor  $\alpha$ ), le TNF- $\alpha$  (pour Tumor Necrosis Factor  $\alpha$ ), ou encore le récepteur Notch et l'Ephrine (Edwards, Handsley, et Pennington 2008 ; Le Gall et al. 2009) sont clivés par ces enzymes. Une approche thérapeutique visant à potentialiser l'activité  $\alpha$ -sécrétase pourrait donc se heurter, du moins théoriquement, à de sévères effets secondaires délétères.

#### b- La voie amyloïdogène :

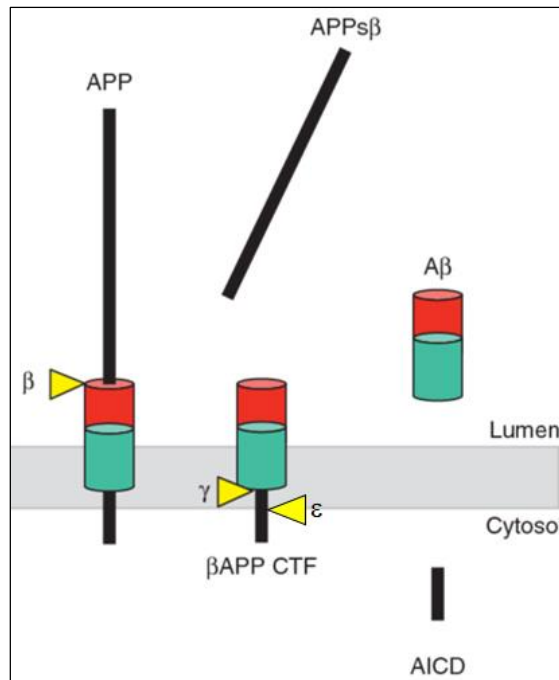


Figure 9 : La voie amyloïdogène (d'après C. Haass et al. 2012)

Une proportion minoritaire de protéine  $\beta$ APP qui échappe au clivage  $\alpha$ -sécrétase, à la membrane plasmique, va être internalisée dans les endosomes puis les lysosomes et emprunter la voie de protéolyse amyloïdogène (Figure 9) où elle va être clivée par l'activité  $\beta$ -sécrétase, dans sa partie N-ter entre la méthionine 596 et l'aspartate 597 de l'isoforme  $\beta$ APP695. Ce clivage produit un fragment N-ter de 110 kDa, sAPP $\beta$ , qui est plus court que sAPP $\alpha$  de 16 aa, pouvant être sécrété par exocytose dans le milieu extracellulaire, et un fragment C-ter d'environ 12 kDa, C99 ou p12 qui reste ancré dans la membrane vésiculaire et qui subit un clivage protéolytique de type  $\gamma$ -sécrétase pour libérer le peptide A $\beta$  dont les formes majoritaires sont les A $\beta$  1-40 et 1-42, et leurs contreparties cytosoliques AICD C50, C57 et C59. Ces coupures vont libérer les extrémités N- et C-ter du peptide A $\beta$  qui sont hétérogènes. La longueur du peptide est étroitement liée à sa pathogénicité (Khaled et al. 2023).

### 1- La $\beta$ -sécrétase :

Cette enzyme est spécifique de la voie amyloïdogène puisqu'elle permet la libération de l'extrémité N-ter du peptide A $\beta$  en clivant la protéine  $\beta$ APP entre le résidu méthionine 671 de la séquence en aa de  $\beta$ APP et l'aspartate 1 de la séquence du peptide amyloïde A $\beta$ . La  $\beta$ -sécrétase est présente dans tous les tissus, les cellules d'origine neuronale et les neurones (Seubert et al. 1993). Les substrats de la  $\beta$ -sécrétase sont tous membranaires. Il a donc été émis l'hypothèse que l'enzyme porteuse de l'activité est soit transmembranaire, soit fortement liée à la membrane

(Martin Citron, Teplow, et Selkoe 1995). D'autres études ont ensuite montré que l'activité  $\beta$ -sécrétase est majoritairement active à pH acide, dans les compartiments subcellulaires de la voie de sécrétion, incluant le TGN ainsi que dans les endosomes (Koo et Squazzo 1994 ; Christian Haass et al. 1995). Entre 1999 et 2000, 5 laboratoires ont publié, quasiment en même temps, leurs travaux sur l'identification de l'enzyme impliquée dans la coupure  $\beta$  de  $\beta$ APP (Hussain et al. 1999 ; Sinha et al. 1999 ; Vassar et al. 1999 ; Yan et al. 1999 ; X. Lin et al. 2000). BACE1 (pour Beta-site APP Cleaving Enzyme 1) est une aspartyl protéase transmembranaire de type 1. Elle est porteuse de l'activité enzymatique clivant  $\beta$ APP au site  $\beta$ . Cependant BACE1 génère aussi une coupure alternative en 11, localisée entre les résidus tyrosine 10 et glutamate 11 (appelée  $\beta'$ -sécrétase) générant ainsi le peptide A $\beta$  11-x (Vassar et al. 1999 ; Cole et Vassar 2008). A ce jour, aucune mutation directement impliquée dans le développement de la MA n'a pu être identifiée sur BACE1 (Cruts et al. 2001 ; H.-C. Liu et al. 2003 ; Hampel et al. 2021). Toutefois, il est maintenant établi que l'activité  $\beta$ -sécrétase augmente significativement dans les cerveaux de patients atteints de formes sporadiques d'Alzheimer (Fukumoto 2002 ; Holsinger et al. 2002 ; Tyler et al. 2002 ; Hampel et al. 2021). Cette augmentation est également observée dans le vieillissement normal, chez la souris, le singe et l'humain non dément (Fukumoto et al. 2004), même si sa conséquence est encore inconnue.

Une deuxième protéine a été décrite comme portant l'activité  $\beta$ -sécrétase. Il s'agit d'une autre aspartyl protéase, BACE2 (Farzan et al. 2000). BACE1 et BACE2 présentent 71% d'homologies de séquence chez l'homme et possèdent un domaine catalytique dans leur partie N-ter. Les BACE 1 et 2 sont surtout présentes au niveau des structures post-golgiennes et des endosomes car leur activité est optimale à pH acide mais on les retrouve aussi à la membrane plasmique (Ehehalt et al. 2002). Dans ces compartiments cellulaires, BACE1 et 2 ont leur site actif du côté luminal de la membrane. Elles sont toutes les 2 exprimées dans le cerveau mais l'expression de BACE2 est nettement plus faible que celle de BACE1 et est principalement localisée au niveau de la microglie (Laird et al. 2005 ; Holler et al. 2012). BACE 1 et 2 doivent s'homodimériser pour être actives entraînant le clivage de leur prodomaine par des furines du TGN. Ensuite, leurs 2 résidus acide aspartique vont être glycosylés et 3 ponts disulfures seront formés (Haniu et al. 2000 ; Westmeyer et al. 2004 ; Hunt et Turner 2009).

- BACE1

Appartenant à la famille des pepsines et des protéases aspartiques rétrovirales, BACE1 est une aspartyl protéase transmembranaire de type I. L'enzyme est majoritairement localisée dans les compartiments intracellulaires acides (TGN, endosomes), c'est pourquoi son activité a un pH optimal bas. L'expression et l'activité de BACE1 sont augmentées dans le cerveau de patients Alzheimer (Yang et al. 2003). La surexpression de l'enzyme entraînerait une augmentation de la sécrétion d'A $\beta$  1-40 et 1-42 (Vassar et al. 1999). En revanche, chez des souris

surexprimant la protéine  $\beta$ APP humaine portant la double mutation suédoise, l'extinction du gène de BACE1 prévient quasiment toute la production de peptide amyloïde (Farzan et al. 2000 ; Laird et al. 2005), faisant d'elle une cible thérapeutique potentiellement intéressante. Malheureusement les souris invalidées (KO) pour la protéine BACE1 ont un comportement moteur altéré et une hypomyélinisation, ce qui augmente leur sensibilité à la douleur. Il a également été observé chez ces animaux une baisse du nombre de synapses des neurones pyramidaux de l'hippocampe entraînant d'importantes altérations comportementales et cognitives (Savonenko et al. 2008). Ceci s'explique probablement par le fait que BACE1 possède d'autres substrats impliqués dans des voies physiologiques importantes (Laird et al. 2005 ; Hitt et al. 2010), comme l' $\alpha$ -2,6-sialyltransferase, une protéine liée à la membrane du Golgi (Kitazume et al. 2001) ou les neurégulines 1 et 3 (Hu et al. 2006).

- BACE2

BACE2 est aussi une protéine membranaire exprimée dans le tissu nerveux, mais de façon beaucoup plus ténue ((B. D. Bennett et al. 2000) et préférentiellement dans la microglie (Laird et al. 2005). Les travaux qui ont pu être réalisés indiquent une contribution mineure de BACE2 dans la MA. Il faut cependant souligner que cette dernière est codée par le chromosome 21 et que sa surexpression dans les cas de syndrome de Down pourrait conduire à une participation plus significative dans la production des plaques séniles dans cette pathologie (Barbiero et al. 2003). Contrairement aux animaux présentant une délétion BACE1, les animaux invalidés (KO) pour BACE2 sont viables, fertiles, de taille normale et ne présentent pas d'anomalies physiques ou comportementales flagrantes (Dominguez et al. 2005).

## 2- Le clivage $\gamma$ -sécrétase :

Après le clivage de la protéine  $\beta$ APP par les  $\alpha$ - ou  $\beta$ -sécrétases, C99 ou C83, les fragments C-ter de  $\beta$ APP résultant de ces coupures restent ancrés à la membrane, où ils peuvent subir une nouvelle protéolyse par la  $\gamma$ -sécrétase. Cette dernière libère, dans la voie non-amyloïdogène 2 peptides, p3 et AICD, sa contrepartie intracellulaire et dans la voie amyloïdogène 2 peptides sont également libérés, A $\beta$  et AICD. Cette activité protéolytique est portée par un complexe multimérique de haut poids moléculaire composé au minimum de 4 protéines transmembranaires : les présénilines 1 et 2 (PS1 et PS2), Aph-1 (pour Anterior pharynx defective-1), Pen-2 (pour Presenilin-enhancer-2) et Nicastrine (NCT) (Vetrivel et al. 2006). Ce complexe  $\gamma$ -sécrétase n'est catalytiquement actif que quand ces 4 protéines sont présentes. En absence de l'une d'entre elles, l'activité  $\gamma$ -sécrétase est totalement abolie (Edbauer et al. 2003). La stœchiométrie du complexe  $\gamma$ -sécrétase serait de 1 :1 :1 :1 pour chaque



partenaire (Kimberly et al. 2003 ; T. Sato et al. 2007 ; Osenkowski et al. 2009). Il existe différents complexes possibles car on dénombre 2 gènes présénilines (PS1 et PS2), 2 gènes Aph-1 chez l'homme (Aph-1a et Aph-1b) et 2 variants d'épissage pour Aph-1a (Aph-1aS et Aph-1aL) (De Strooper 2003 ; Gu et al. 2003). Chez des souris invalidées pour certaines sous-unités (PS1 vs PS2, ou Aph-1a vs Aph-1b) les phénotypes sont différents, ce qui pourrait démontrer que ces complexes aient des spécificités distinctes concernant leurs substrats. L'activité  $\gamma$ -sécrétase est présente au niveau des endosomes et des lysosomes.

- Les présénilines (PS)

PS1 ou PS2 sont les 2 enzymes qui constituent le cœur catalytique du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Wolfe et al. 1999), notamment de par les aspartates 257 et 385 (Tolia, Chávez-Gutiérrez, et Strooper 2006). Ce sont des protéines transmembranaires d'environ 50 kDa, présentant 67% d'homologie dans leur séquence protéique. Elles sont ubiquitaires et particulièrement importantes dans le cerveau notamment lors du développement (M. K. Lee et al. 1996). Les PS sont majoritairement exprimées dans le RE et l'appareil de Golgi, mais de plus faibles quantités sont aussi retrouvées à la membrane plasmique. Les scientifiques ont beaucoup discuté leur structure mais aujourd'hui il existe un consensus et on les décrit comme possédant 9 domaines transmembranaires (Henricson, Käll, et Sonnhammer 2005), une partie N-ter intracellulaire et une partie C-ter extracellulaire (Laudon et al. 2005). Une boucle hydrophile est également située entre les domaines transmembranaires 6 et 7, dans le cytoplasme (Doan et al. 1996 ; Fortini 2002). Sous leur forme holoprotéique, les PS sont inactives. Celles-ci seraient clivées autocatalytiquement ou pas (Fukumori et al. 2010) au niveau des aspartates 257 et 385 (Nyabi et al. 2003). Dans le RE (Kaether et al. 2004), les PS subiraient un clivage endoprotéolytique par la présénilase dans la boucle cytosolique (Thinakaran et al. 1996) libérant 2 fragments, le N-ter et le C-ter (S.-H. Kim et al. 2004 ; Capell et al. 2005). Ensemble ces 2 fragments forment un complexe hétérodimérique biologiquement stable et fonctionnel (Thinakaran et al. 1996 ; Capell et al. 1998 ; Tolia, Chávez-Gutiérrez, et Strooper 2006).

Ce sont des études de liaisons génétiques sur des formes familiales de MA qui ont identifié PS1 et PS2 (Cruts et al. 1995 ; Sherrington et al. 1995 ; RogaeV et al. 1995 ; Mike Hutton et al. 1996). Le gène de PS1 se situe sur le chromosome 14 et celui de PS2 sur le 1. Les PS sont décrites comme nécessaires pour le clivage  $\gamma$ -sécrétase de  $\beta$ APP (De Strooper et al. 1998). En effet, dans le domaine transmembranaire 7 un motif consensus hautement conservé et contenant 1 des 2 aspartates formant le site actif du complexe  $\gamma$ -sécrétase a été identifié. Des mutations au niveau de ce motif rendraient les PS inactives. Ainsi, pour empêcher l'activation des PS, la mutation d'un des 2 aspartates suffit (Wolfe et al. 1999 ; C. Sato et al. 2006). D'ailleurs, l'une des mutations (P117L sur PS1) des formes familiales de MA les plus agressives est

située dans ce motif, prouvant son importance dans l'activité  $\gamma$ -sécrétase (Steiner et Haass 2000).

- La nicastrine (NCT)

La NCT a été découverte par chromatographie d'affinité (G. Yu et al. 2000 ; Esler et al. 2002). C'est une glycoprotéine transmembranaire de type 1 de 130 kDa (Fortini 2002), identifiée et clonée par co-immunoprécipitation avec les PS par l'équipe du Pr. St George-Hyslop. NCT possède un domaine transmembranaire avec un site d'interaction primaire pour PS et Aph1 (Capell et al. 2003). Elle possède un motif hautement conservé au niveau de son ectodomaine en N-ter qui entrainerait un changement de conformation nécessaire à la formation du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Shirotani et al. 2003). En revanche, sa partie cytoplasmique serait impliquée dans l'ancrage de la protéine à la membrane (Shirotani et al. 2003). Ainsi la NCT semble être primordiale à l'assemblage et la maturation du complexe  $\gamma$ -sécrétase (Chávez-Gutiérrez et al. 2008) comme décrit plus bas (voir -La formation du complexe  $\gamma$ -sécrétase).

Durant sa maturation, son large ectodomaine subit de complexes glycosylations (G. Yu et al. 2000 ; Turner et al. 2003) qui sont essentielles pour la bonne conformation du domaine extracellulaire permettant la formation et la maturation du complexe pour une activité optimale. Sa partie N-ter serait impliquée dans la reconnaissance des substrats, mais participerait aussi à la liaison d'autres protéines avec un domaine extracellulaire comme  $\beta$ APP et potentiellement servir de récepteur pour la  $\gamma$ -sécrétase (Shirotani et al. 2003 ; Shah et al. 2005 ; Dries et al. 2009). Chez la souris, l'invalidation de la NCT est létale (T. Li et al. 2003). Aucune régulation transcriptionnelle n'a été rapportée à ce jour. La protéine est localisée avec les PS dans le RE et l'appareil de Golgi. Son expression a été retrouvée comme étant plus forte dans le cerveau.

Au laboratoire, notre équipe a montré que la NCT contrôle la mort cellulaire via les voies PI3K/Akt et p53-dépendantes. Cette fonction reste indépendante de l'activité et de l'intégrité moléculaire des complexes  $\gamma$ -sécrétase (Pardossi-Piquard et al. 2009).

- L'Anterior pharynx defective 1 (Aph-1)

La protéine Aph1 est une protéine d'environ 30 kDa identifiée par un crible génétique lié à l'activité  $\gamma$ -sécrétase et interagissant avec les PS (Francis et al. 2002 ; Goutte et al. 2002). Chez l'homme, il existe 2 protéines homologues de Aph1 (Aph1a et Aph1b). De plus le gène pour Aph1a peut subir un épissage alternatif générant Aph1-aS (short) et Aph1-aL (long). Ces différentes formes de protéines Aph1 sont transmembranaires et possèdent respectivement 7 domaines, transmembranaires

avec le N-ter extracellulaire et le C-ter dans le cytosol (Fortna et al. 2004). Aph1 est exprimée dans le RE et l'appareil de Golgi. Dans son domaine transmembranaire 4, un motif conservé GxxxG a été identifié comme nécessaire dans la régulation des activités de type  $\gamma$ -sécrétase dépendantes des PS (Niimura et al. 2005) grâce à l'interaction fonctionnelle de la protéine avec les PS et la NCT. Aph1 interagit avec la NCT pour former un précomplexe au niveau du RE, via plusieurs de ses domaines transmembranaires, pour ensuite être maturé dans l'appareil de Golgi (Takasugi et al. 2003). Son domaine transmembranaire 4 peut aussi se lier à Pen2 via le motif GxxxG (S.-F. Lee et al. 2004 ; Araki et al. 2006). On décrit Aph1 comme le constituant le plus stable du complexe et représentant l'élément initial de son assemblage (Tolia et De Strooper 2009).

- La Préséniline Enhancer 2 (Pen-2)

Tout comme NCT et Aph1, Pen2 a été identifié comme interagissant physiquement avec les PS (Francis et al. 2002). C'est une protéine transmembranaire de 12 kDa qui possède 2 domaines transmembranaires dont les extrémités sont extracellulaires (Takasugi et al. 2003). Ses domaines extracellulaires lui permettraient d'interagir fonctionnellement avec les PS dans la régulation des activités de type  $\gamma$ -sécrétase dépendantes de celles-ci. Ils lui permettraient aussi de réguler l'endoprotéolyse des PS (Crystal et al. 2003 ; Luo et al. 2003). C'est plus précisément le domaine transmembranaire 1 et le C-ter qui seraient nécessaires à cette endoprotéolyse et par conséquent à l'activation des PS (Prokop, Haass, et Steiner 2005). Pen2 est exprimée dans le RE et l'appareil de Golgi.

Le rôle exact des protéines Aph-1 et Pen-2 dans le complexe  $\gamma$ -sécrétase n'est pas encore identifié mais elles pourraient être impliquées dans l'assemblage, la maturation, le transport ou la stabilisation du complexe. Au laboratoire, nous avons aussi montré que Aph-1a et Pen-2 endogènes résistent à la protéolyse par les caspases et par le protéasome. Elles peuvent avoir un rôle dans les processus de contrôle de la mort cellulaire dépendante des PS mais indépendante de l'activité catalytique (Dunys, Kawarai, Giaime, et al. 2007).

### 3- La formation du complexe $\gamma$ -sécrétase :

L'assemblage des 4 composants du complexe  $\gamma$ -sécrétase n'est pas aléatoire mais se fait de façon ordonnée. Initialement, un sous-complexe NCT-Aph1 va se former. Ce sous-complexe est stable même sans PS et Pen2 (Shirotani et al. 2004). 2 hypothèses sont ensuite possibles pour l'assemblage de la  $\gamma$ -sécrétase (Spasic et Annaert 2008) : soit PS se lie au sous-complexe et Pen2 s'y joint ensuite entraînant l'endoprotéolyse de PS (LaVoie et al. 2003 ; Niimura et al. 2005), soit 2 complexes intermédiaires se formeraient : NCT-Aph1 et Pen2-PS. En effet, Pen2 semble

capable de fixer PS indépendamment de NCT et Aph1 (Fraering et al. 2004). Ce complexe intermédiaire se formerait avant ou durant l'endoprotéolyse de PS. Cependant ces 2 hypothèses sont anciennes et il existe dorénavant un consensus pour la première (Figure 10) (Gertsik, Chiu, et Li 2015).

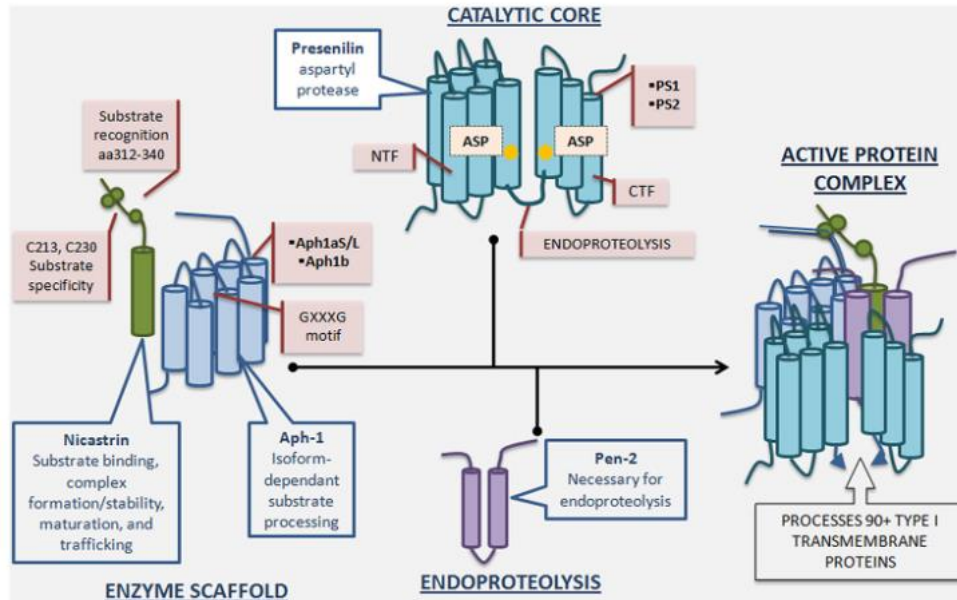


Figure 10 : Formation du complexe  $\gamma$ -sécrétase et rôles des sous-unités (d'après Gertsik, Chiu, et Li 2015)

Ainsi chez l'homme 6 complexes différents seront formés selon leur localisation tissulaire car il existe 2 PS (PS1 et PS2) et 3 Aph1 (Aph1-aS, Aph1-aL et Aph1b) (Hébert et al. 2004 ; Shirotani et al. 2004). Les différents complexes  $\gamma$ -sécrétases ainsi produits auraient des propriétés biochimiques différentes et une distribution subcellulaire distincte qui pourrait conditionner leur spécificité vis-à-vis de leurs substrats (Meckler et Checler 2014 ; 2016 ; Sannerud et al. 2016). En effet, les complexes contenant PS1 ou PS2 n'ont pas les mêmes efficacités dans le clivage de C99 et présenteraient différentes susceptibilités à des inhibiteurs de  $\gamma$ -sécrétase (Mastrangelo et al. 2005 ; Bentahir et al. 2006). Une structure 3D a été proposée et sert de base moléculaire à la compréhension mécanistique de la fonction de la  $\gamma$ -sécrétase (Bai et al. 2015).

Même si les PS portent l'activité  $\gamma$ -sécrétase à elles seules (Ahn et al. 2010) et que 6 complexes existent (De Strooper 2003), pour fonctionner cette sécrétase doit cependant être obligatoirement composée de 4 partenaires qui interagissent ensemble et se modulent les uns les autres (Takasugi et al. 2003 ; Kaether et al. 2004).

#### 4- Les mécanismes de clivage de la $\gamma$ -sécrétase :

La protéine  $\beta$ APP est le premier substrat de la  $\gamma$ -sécrétase identifié. Depuis, on sait que cette protéase peut cliver plus de 100 autres protéines transmembranaires de type I (De Strooper, Vassar, et Golde 2010 ; Güner et Lichtenthaler 2020). C'est notamment le cas du récepteur Notch impliqué dans une cascade de signalisation essentielle au développement de la plupart des organismes multicellulaires (De Strooper et al. 1999). Ces 2 substrats n'ont pas les mêmes séquences consensus au niveau de leur site de clivage, mais dans le domaine transmembranaire et la région juxta-membranaire luminale de  $\beta$ APP et Notch, des résidus hydrophobes ont été identifiés comme essentiels dans l'efficacité et la spécificité du clivage (Tesco et al. 2005 ; Ren et al. 2007).

Les clivages de la protéine  $\beta$ APP par la  $\gamma$ -sécrétase ne seraient pas uniques mais constitué de plusieurs clivages successifs. C'est également le cas pour Notch vu ci-dessus (Chandu, Huppert, et Kopan 2006). En effet, la  $\gamma$ -sécrétase cliverait  $\beta$ APP sur 3 sites différents ( $\gamma$ ,  $\zeta$  et  $\varepsilon$ ) qui pourraient varier en fonction de l'épaisseur de la membrane où elle se situe ou en fonction de la composition du complexe et donc de son activité. Ces différences conduisent ainsi à la formation de peptide  $A\beta$  de longueurs différentes. En plus du clivage classique au site  $\gamma$  qui génère  $A\beta$  40 et  $A\beta$  42, le clivage au site  $\zeta$  produit  $A\beta$  45 et  $A\beta$  46 et celui au site  $\varepsilon$   $A\beta$  48 et  $A\beta$  49. Ces clivages se produiraient séquentiellement en commençant de  $\varepsilon$  à  $\gamma$  et formant  $A\beta$  38 et  $A\beta$  43. (T. Sato et al. 2005 ; Takami et al. 2009). Si différents peptides  $A\beta$  sont produits, différents AICD le sont aussi : C50, C53, C57 et C59 (T. Sato et al. 2003). L'hypothèse la plus reconnue est qu'il y a d'abord un premier clivage au site  $\varepsilon$  qui produit principalement AICD 50 et  $A\beta$  49. Puis rapidement une activité carboxypeptidase raccourcit l'extrémité C-ter tous les 3 à 4 résidus selon 2 voies de clivages pour générer  $A\beta$  46/43/40 ou  $A\beta$  45/42/38 (Wolfe 2020 ; Checler et al. 2021) (Figure 11). Ceci explique pourquoi en condition endogène, seul AICD 50 est détecté.

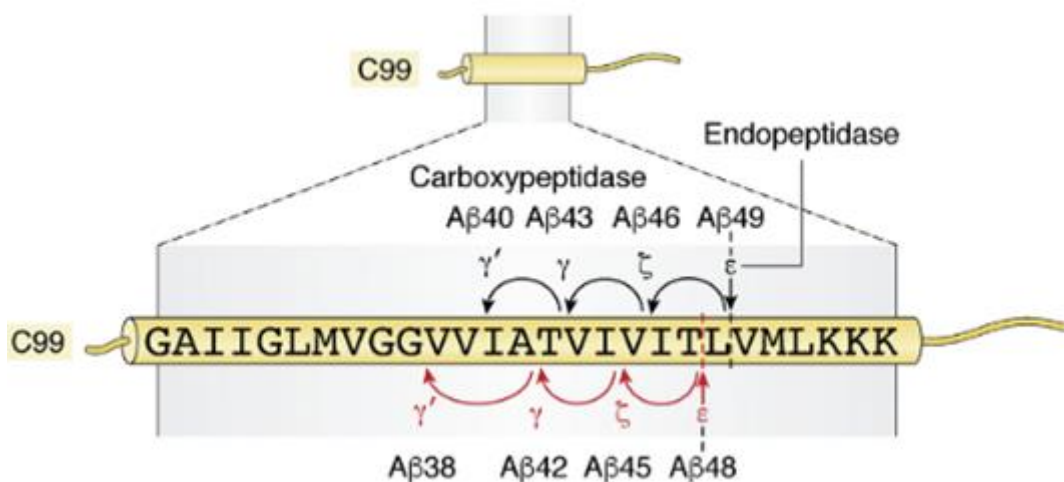


Figure 11 : Les 2 voies de clivages générant le peptide A $\beta$  40 et le peptide A $\beta$  42 (d'après Checler et al. 2021)

Ainsi, la  $\gamma$ -sécrétase clive ses différents substrats à de multiples positions dans le domaine transmembranaire (Qi-Takahara et al. 2005). Ainsi, on peut supposer que les A $\beta$  49 et A $\beta$  46 sont les précurseurs du peptide A $\beta$  40 alors qu'A $\beta$  48 et A $\beta$  45 sont ceux du peptide A $\beta$  42. C'est donc potentiellement l'activité  $\gamma$ -sécrétase qui détermine la nature du peptide A $\beta$  généré (40 ou 42) et l'augmentation de l'épaisseur de la membrane qui module la génération de peptide A $\beta$  (Dawkins et al. 2023).

#### 5- La régulation de la $\gamma$ -sécrétase :

Son assemblage, sa maturation ou même son activité peuvent être contrôlés. Ainsi cette régulation pourrait se faire au moment de l'assemblage de la  $\gamma$ -sécrétase. En effet, la phospholipase D1 (PLD1) se fixerait spécifiquement sur PS1 induisant une diminution de la production de peptide A $\beta$ . PS1 recruterait PLD1 dans le réseau Golgi/trans-Golgi et cette interaction provoquerait un désassemblage complet de la  $\gamma$ -sécrétase (D. Cai et al. 2006). Certains composés peuvent aussi cibler son site catalytique et affecter l'ensemble des clivages de tous ses substrats. D'autres comme les benzodiazepines, le DAPT (un puissant inhibiteur dipeptidique de la  $\gamma$ -sécrétase) et les sulfonamides inhibent le clivage préférentiellement au niveau du site  $\gamma$ , diminuant la production d'A $\beta$  40 et 42 (Sousuke Yagishita et al. 2006). Les anti-inflammatoires non stéroïdiens aboliraient spécifiquement la production d'A $\beta$  42 (Weggen et al. 2001 ; 2003 ; I.-F. Ling et al. 2015 ; Patrick L. McGeer et al. 2018). Dans le cas contraire, d'autres facteurs sont activateurs de la  $\gamma$ -sécrétase. C'est le cas de l'ATP (pour Adénosine Tri-Phosphate) sur le clivage de  $\beta$ APP (Fraering et al. 2005). Ainsi, utiliser des inhibiteurs de tyrosine kinase, qui sont capables de transférer un phosphate de l'ATP, ciblant les sites de fixation de  $\beta$ APP, serait intéressant dans un but de traitement thérapeutique. D'autres partenaires du complexe  $\gamma$ -sécrétase non essentiels au clivage le régule cependant, comme CD147 (Zhou et al. 2005), TMP21 (F. Chen et al. 2006), GSAP (G. He et al. 2010). En effet, une récente publication explique la régulation de GSAP sur le complexe  $\gamma$ -sécrétase par un changement de conformation de PS1 (Wong et al. 2019).

D'un point de vue thérapeutique, après la découverte de la  $\gamma$ -sécrétase, de nombreuses recherches ont été menées pour développer des inhibiteurs puissants mais les essais cliniques basés sur ces derniers ont tous échoué. En effet, aucun d'entre eux n'a permis d'améliorer le déclin cognitif lié à la maladie d'Alzheimer et, parfois même, ils l'ont aggravé. Dans la plupart de ces essais, les taux d'A $\beta$  dans le plasma ou le LCS ont été significativement diminués, indiquant ainsi clairement qu'une réduction de l'A $\beta$  total n'était pas suffisante pour restaurer les fonctions cognitives (Checler et al. 2021). En raison du grand nombre de substrats différents de la  $\gamma$ -sécrétase, il s'est avéré difficile de cibler spécifiquement et exclusivement le

clivage de  $\beta$ APP médié par cette dernière. Ainsi, le développement thérapeutique s'est concentré sur les modulateurs de la  $\gamma$ -sécrétase qui sont censés être plus sûrs, car ils interagissent avec le complexe  $\gamma$ -sécrétase par le biais du site de liaison allostérique, modifiant ainsi l'activité de l'enzyme mais ne la bloquant pas (Bursavich, Harrison, et Blain 2016). Le concept de modulation de la  $\gamma$ -sécrétase a été découvert avec certains anti-inflammatoires non stéroïdiens tels que le flurbiprofène, l'indométhacine et l'ibuprofène, qui sont considérés comme des modulateurs de la  $\gamma$ -sécrétase, car ils induisent des changements de conformation dans la protéine PS1 et déplacent le clivage du fragment C99 vers des espèces de peptides  $A\beta$  plus courtes telles que  $A\beta$  37 et  $A\beta$  38 (Lleó et al. 2004 ; Takeo et al. 2014).

#### 6- L'activité $\gamma$ -sécrétase indépendante des PS :

Il semblerait qu'il existe aussi une activité  $\gamma$ -sécrétase indépendante des PS. En effet, des études mettent en évidence une production du peptide  $A\beta$  en absence des PS. En 2001, notre laboratoire a pu observer la présence de peptide  $A\beta$ , produit à partir de la protéine  $\beta$ APP endogène, dans le milieu intracellulaire ainsi que dans le milieu de sécrétion de cellules dépourvues de PS1 et PS2 (Armogida et al. 2001). Ces résultats ont été confirmés en 2002 avec la production d' $A\beta$  40 et  $A\beta$  42 dans des cultures primaires de neurones corticaux dans lesquels les gènes codant pour les PS sont invalidés. L'équipe a montré que si la production d' $A\beta$  40 et  $A\beta$  42 sécrétée est bien réduite en l'absence des PS, la production intracellulaire d' $A\beta$  42 n'est, elle, pas affectée (C. A. Wilson et al. 2002). En 2004 une étude apporte la confirmation *in vivo* des précédents résultats. En effet, une réduction drastique de la production de peptide  $A\beta$  total a été observée dans les cerveaux de souris invalidées de façon conditionnelle pour PS1 (sur fond génétique PS2<sup>-/-</sup>). Cependant, une faible quantité de peptide  $A\beta$  42 demeure produite dans le cerveau de ces animaux, preuve d'une production *in vivo* de peptide  $A\beta$  par une activité  $\gamma$ -sécrétase indépendante des PS (Beglopoulos et al. 2004). L'activité catalytique des PS et ses autres fonctions dans la génération, la stabilisation et le transport du complexe  $\gamma$ -sécrétase peuvent être séparées et étend le concept selon lequel les présénilines sont des protéines multifonctionnelles (Nyabi et al. 2003).

#### 7- Les fragments protéolytiques de la protéine $\beta$ APP :

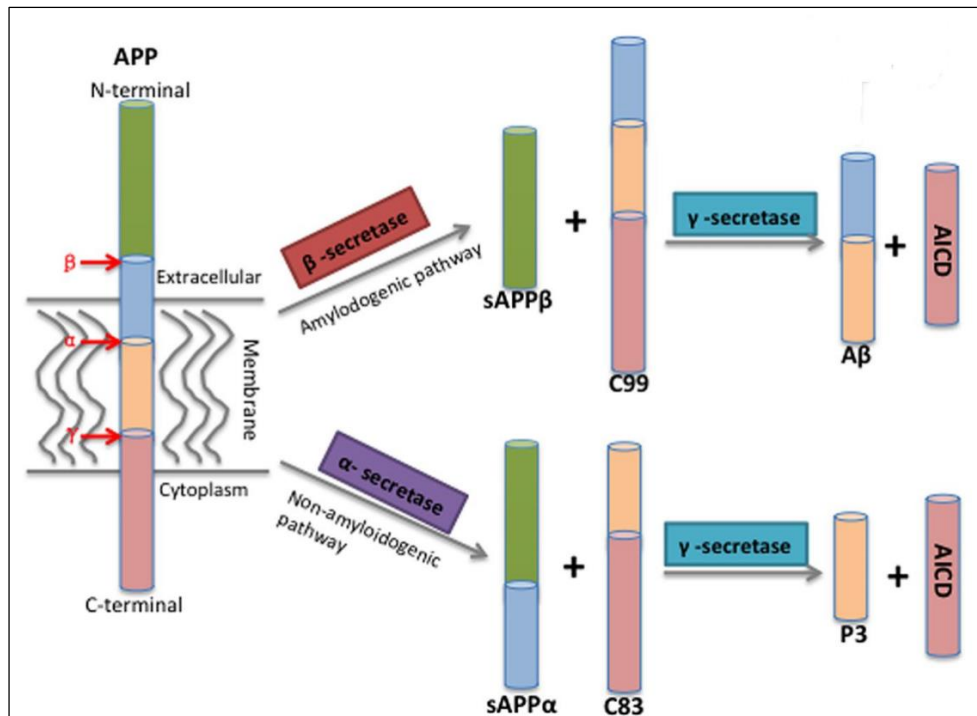


Figure 12 : Les différents fragments issus de la protéine  $\beta$ APP suite à l'action des sécrétases (d'après Sun et al, 2015)

Comme décrit ci-dessus, les différents clivages de la protéine  $\beta$ APP engendrent différents fragments (Figure 12) présentant des fonctions diverses.

- Le fragment  $sAPP\alpha$

Issu du clivage  $\alpha$ -sécrétase, c'est un fragment neuroprotecteur de la protéine  $\beta$ APP. Il permet la croissance neuritique, la synaptogenèse, l'adhésion cellulaire (M. P. Mattson 1997 ; Gakhar-Koppole et al. 2008), c'est un facteur de croissance (Herzog et al. 2004 ; Siemes et al. 2006) qui régule la prolifération des cellules souches neurales (Ohsawa et al. 1999 ; Caillé et al. 2004), enfin il favorise l'apprentissage et la mémoire (Meziane 1998 ; Taylor et al. 2008). Certaines mutations de PS1 réduisent la production de  $sAPP\alpha$  (Karine Ancolio et al. 1997). En s'associant directement à BACE1,  $sAPP\alpha$  modulerait le métabolisme de  $\beta$ APP et réduirait la production de peptide  $A\beta$  (Obregon et al. 2012).

- Le fragment C83

Il est la contrepartie membranaire de  $sAPP\alpha$  sécrété, de 83 aa issu du clivage  $\alpha$ -sécrétase. Il est théoriquement substrat du clivage par l'activité  $\gamma$ -sécrétase



produisant le peptide p3 constitué de 23 (p3-40) à 25 (p3-42) aa et du fragment AICD, la contrepartie cytosolique. Cependant comparé au fragment C99, peu d'AICD transcriptionnellement actif proviendrait de cette voie (Goodger et al. 2009 ; Belyaev et al. 2010 ; Flammang et al. 2012). Par ailleurs, le fragment C83 peut être issu du clivage  $\alpha$ -sécrétase du fragment C99. Le fragment C83, produit par la voie non-amyloïdogène, pourrait cependant être substrat des caspases pour produire le fragment C31 qui possède des fonctions toxiques (Dumanchin-Njock et al. 2001).

- Le fragment sAPP $\beta$

Issu du clivage de la protéine  $\beta$ APP par la  $\beta$ -sécrétase, ce fragment ne possède pas les effets bénéfiques du fragment sAPP $\alpha$  malgré la grande similitude dans leur séquence, à l'exception des 16 derniers aa C-ter (Furukawa, Barger, et al. 1996 ; Furukawa, Sopher, et al. 1996 ; Chasseigneaux et Allinquant 2012 ; Yun et al. 2020).

- Le fragment C99

C'est la contrepartie membranaire du fragment sAPP $\beta$  extracellulaire, constitué de 99 aa issu du clivage  $\beta$ -sécrétase. Le peptide A $\beta$  1-40 contient les 40 premiers aa N-ter de C99. L'activité  $\gamma$ -sécrétase sur le fragment C99 produit le peptide A $\beta$  de 38 à 43 aa. De plus, d'un point de vue enzymatique, le peptide AICD est produit plus efficacement, in vitro, à partir du fragment C99 (Goodger et al. 2009 ; Belyaev et al. 2010 ; Flammang et al. 2012). En effet, le complexe  $\gamma$ -sécrétase possède une meilleure efficacité catalytique pour le fragment C99 que pour C83.

Au stade précoce de la maladie, la détection d'A $\beta$  est minoritaire par rapport à celle de C83 et C99. Mon équipe a d'ailleurs montré dans les souris 3xTg-AD que l'accumulation du C99 a lieu bien avant celle d'A $\beta$  (Lauritzen et al. 2012) et contribuerait de manière précoce aux déficits synaptiques et cognitifs (R. Pardossi-Piquard et al. 2016 ; Bourgeois et al. 2018). De plus, le fragment C99 serait responsable d'un dysfonctionnement lysosomal-autophagique (Lauritzen et al. 2016) et de perturbations mitochondriales et mitophagiques (Vaillant-Beuchot et al. 2021).

De plus, plusieurs études confirment une accumulation du fragment C99 chez l'homme non seulement dans des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) exprimant différentes mutations ou provenant de patients portants des mutations responsables de formes familiales de la MA (C. O. Y. Hung et Livesey 2018 ; Kwart et al. 2019), mais également plus directement dans les cerveaux de patients Alzheimer (Hébert et al. 2008 ; Pera et al. 2013). De plus, une récente étude de l'équipe de Paul Grenngard montre que le niveau de C99 détecté in situ chez les patients atteints de formes sporadiques de MA, par une nouvelle technique d'une

très haute sensibilité (Proximity Ligation Assay ou PLA), corrèle avec leur dégénérescence et leurs déficits cognitifs (Pulina et al. 2020).

Dans les cas sporadiques et familiaux de la MA (Pera et al. 2013 ; Kametani et Hasegawa 2018), une forte accumulation de C99 est observée. L'ensemble de ces données suggèrent son rôle primordial dans l'initiation de la maladie, à l'inverse d'A $\beta$  (Nixon 2017 ; Lauritzen et al. 2019 ; Checler et al. 2021).

- Le fragment AICD

Issu du clivage des fragments C83 et C99 par la  $\gamma$ -sécrétase, l'AICD peut théoriquement être produit par les voies non- et amyloïdogènes mais il est majoritairement produit par la voie amyloïdogène (Goodger et al. 2009 ; Belyaev et al. 2010 ; Flammang et al. 2012). Selon le site de clivage de la  $\gamma$ -sécrétase sur la protéine  $\beta$ APP, le fragment AICD peut avoir des longueurs différentes. Les espèces AICD 48, 50 et 51 ont été détectées, la forme AICD 50 étant majoritaire (C. Yu et al. 2001 ; T. Sato et al. 2003). Sa grande instabilité rend son étude difficile. AICD est rapidement dégradé et/ou clivé par la caspase-3, produisant le fragment C31 (Lu et al. 2000 ; Dumanchin-Njock et al. 2001). Il est libéré dans le cytoplasme et transloque au noyau où il exerce des fonctions dans la signalisation nucléaire (Cao et Südhof 2001 ; Von Rotz et al. 2004). L'AICD est stabilisé par la formation d'un complexe avec Fe65 et Tip60 et régule l'expression de gènes tels que la néprilysine, LRP1, p53, GSK-3 $\beta$  et le récepteur à l'EGF (pour Epidermal Growth Factor) (Baek et al. 2002 ; H.-S. Kim et al. 2003 ; Cao et Südhof 2004 ; Raphaëlle Pardossi-Piquard et al. 2005 ; Alves Da Costa et al. 2006 ; Q. Liu et al. 2007 ; Yun-wu Zhang et al. 2007). L'AICD est impliqué dans de nombreuses fonctions, notamment (de manière non exhaustive) les homéostasies du calcium et de l'ATP (Hamid et al. 2007), la régulation du trafic intracellulaire et la dynamique du cytosquelette (Ghosal et al. 2009), la mort cellulaire (Alves Da Costa et al. 2006) et la dégradation du peptide A $\beta$  (R. Pardossi-Piquard et al. 2006 ; Belyaev et al. 2009) contribuant à la MA (Pardossi-Piquard et Checler 2012).

Les 2 voies (non- et amyloïdogène) sont en compétition. Ainsi, l'une des pistes thérapeutiques visant à diminuer la production de peptide A $\beta$  consiste à favoriser la voie non-amyloïdogène. Les mécanismes principaux de ce métabolisme sont assez bien décrits mais fortement dirigés sur les grands acteurs de celui-ci, c'est-à-dire les sécrétases. Ainsi le développement d'autres approches thérapeutiques ciblant ces sécrétases a été réalisé afin, une nouvelle fois, de limiter la production du peptide A $\beta$ . Malheureusement, la faible spécificité de ces enzymes pour leurs substrats (plusieurs centaines pour la  $\gamma$ -sécrétase) limite les effets bénéfiques de ces approches générant fréquemment des effets indésirables (Panza et al. 2019). C'est pourquoi, une meilleure connaissance des autres acteurs impliqués de ce métabolisme et des mécanismes de régulation annexes ouvrirait de nouvelles

perspectives thérapeutiques. Si les formes familiales de la MA n'affectent que les gènes de  $\beta$ APP et des présénilines 1 et 2, entraînant une augmentation de la production et/ou du clivage de  $\beta$ APP, les formes sporadiques sont beaucoup plus complexes. En effet, ces formes seraient caractérisées par un déséquilibre dans la balance du métabolisme de  $\beta$ APP, c'est-à-dire l'équilibre entre production/dégradation, entre voie non-amyloïdogène/voie amyloïdogène et entre  $A\beta_{40}/A\beta_{42}$ . Il est donc primordial de mieux comprendre ces événements qui modulent le métabolisme de  $\beta$ APP comme par exemple le trafic vésiculaire ou les voies de dégradation.

#### 8- Le métabolisme de $\beta$ APP par l' $\eta$ -sécrétase :

De nouvelles sécrétases impliquées dans le processus physiopathologique de la MA ont été découvertes. L'une d'elles, l' $\eta$ -sécrétase, est caractérisée par l'action de la métalloprotéinase MT5-MMP (pour Membrane-Type 5-Matrix MetalloProteinase ou MMP24) (Baranger et al. 2016 ; 2017) qui clive la  $\beta$ APP entre l'asparagine 504 et la méthionine 505 entraînant la production des fragments sAPP $\eta$  (environ 80 kDa) et CTF- $\eta$  (environ 30 kDa). Ce dernier est clivé par les  $\alpha$ - ou  $\beta$ -sécrétases produisant le peptide A $\eta$ - $\alpha$  et le fragment CTF- $\alpha$ , et les peptides A $\eta$ - $\beta$  et CTF- $\beta$ . Les 2 fragments CTF- $\alpha$  et CTF- $\beta$  peuvent être clivés par la  $\gamma$ -sécrétase, produisant p3 ou le peptide A $\beta$ . Dans notre laboratoire nous avons montré la présence du fragment CTF- $\eta$  dans les exosomes (Afram et al. 2023). Dans le LCS humain, environ 5 fois plus de peptide A $\eta$  serait retrouvé par rapport au peptide A $\beta$  ce qui indique que l' $\eta$ -sécrétase est importante dans le métabolisme de  $\beta$ APP. Chez les patients Alzheimer, dans les neurites dystrophiques, une accumulation de CTF- $\eta$  a été observée. De même que, l'expression du peptide A $\eta$ - $\alpha$  dans les cellules ou chez des souris *in vivo* réduirait la LTP et l'activité des neurones hippocampaux (Willem et al. 2015).

#### 9- Le métabolisme de $\beta$ APP par la $\delta$ -sécrétase :

Une autre sécrétase découverte il y a peu est la  $\delta$ -sécrétase qui se caractérise par l'action de l'asparagine endopeptidase (AEP) qui clive après les résidus asparagines. La suppression de propeptides en N- et C-ter, à pH 6, est nécessaire pour activer l'AEP. Cette dernière clive la  $\beta$ APP au niveau des résidus asparagine 373 et asparagine 585 produisant 2 fragments : CTF- $\delta$ 374 (qui correspond à  $\beta$ APP de l'acide aminé 374 à 695) et CTF- $\delta$ 586 (qui correspond à  $\beta$ APP de l'acide aminé 586 à 695) dans les endosomes. Comme pour CTF- $\eta$ , les 2 fragments CTF- $\delta$ 374 et  $\delta$ 586 subissent des coupures par l' $\alpha$ - ou la  $\beta$ -sécrétase produisant du peptide A $\beta$ . Le clivage de  $\beta$ APP après le résidu asparagine 585 par la  $\delta$ -sécrétase améliorerait le métabolisme du CTF- $\delta$ 586 par BACE1 augmentant ainsi la production d'A $\beta$ . De plus, le fragment  $\beta$ APP composé des aa allant de 1 à 373 semble être neurotoxique. On

sait que les niveaux d'AEP augmente avec l'âge. C'est également le cas des fragments  $\beta$ APP 1-373,  $\beta$ APP 1-585 et CTF- $\delta$ 586, chez les patients Alzheimer par rapport aux sujets sains. Chez des souris transgéniques des modèles Alzheimer 5xFAD ou APP/PS1, l'absence d'AEP améliore la LTP et restaure la perte synaptique et la densité des épines dendritiques (Z. Zhang et al. 2015). Le clivage de la  $\beta$ APP par l'AEP pourrait donc contribuer à la physiopathologie de la MA (Z. Zhang, Xie, et Ye 2016 ; Z. Wu et al. 2020).

#### 10-Les autres voies de clivage de $\beta$ APP :

En N-ter, le clivage de  $\beta$ APP sur 3 sites différents est également possible par la métalloprotéase Meprin- $\beta$  produisant des fragments sAPP $\beta$  1-124, 1-305 ou 1-308, sAPP $\beta^*$  (possède un résidu de plus par rapport à sAPP $\beta$ ) et un fragment C99\* (possède un résidu de moins par rapport à C99). Le clivage successif par la  $\gamma$ -sécrétase produira un peptide A $\beta$  2-x. Les fragments issus de ce métabolisme n'auraient aucune toxicité dans les cultures primaires de neurones (Jefferson et al. 2011 ; Becker-Pauly et Pietrzik 2017 ; Bayer 2022).

En C-ter, les caspases cliveraient également  $\beta$ APP, et plus précisément après l'asparagine 664 générant un peptide C31. Ce dernier serait toxique in vitro conduisant à la mort cellulaire de façon  $\beta$ APP dépendante, mais cela reste controversé in vivo (Lu et al. 2003 ; Nhan, Chiang, et Koo 2015). Tout comme la contrepartie N-ter de C31 du fragment C99, un peptide nommé Jcasp, très instable, aurait des propriétés pro-apoptiques (Bertrand et al. 2001).

### C-L'homéostasie et la régulation du métabolisme de $\beta$ APP :

La modulation du métabolisme de  $\beta$ APP est fortement liée à la dynamique membranaire. En effet, les caractéristiques physico-chimiques de la membrane mais aussi sa teneur en radeaux lipidiques sont modifiées par sa composition en phospholipides et en cholestérol. Dans la plupart des métabolismes qui ont lieu à la membrane, ces radeaux sont primordiaux car ils concentrent les protéines interagissant entre elles et facilitent l'endocytose. La  $\beta$ - et la  $\gamma$ -sécrétase sont présentes dans ces radeaux lipidiques et une forte concentration en cholestérol les réorganiserait augmentant l'activité des 2 sécrétases (Wahrle et al. 2002 ; Cordy et al. 2003). En revanche, une faible concentration en cholestérol à la membrane faciliterait l'activité  $\alpha$ -sécrétase (Kojro, Gimpl, et Lammich 2001 ; Querfurth et LaFerla 2010). Des protéines membranaires stabiliseraient la  $\beta$ APP à la membrane

plasmique, retardant son internalisation et favorisant ainsi l' $\alpha$ -sécrétase au détriment de la voie amyloïdogène. C'est le cas notamment de Fe65 (Fiore et al. 1995).

La protéine  $\beta$ APP membranaire est préférentiellement engagée dans la voie non-amyloïdogène et génère le fragment sAPP $\alpha$  qui est directement libéré dans le milieu extracellulaire. La voie amyloïdogène est minoritaire et produit A $\beta$  à l'intérieur des endosomes et des lysosomes. Dans le cadre de la MA, cette voie est favorisée et conduit à une sécrétion d'A $\beta$ . La voie permettant de faire transiter A $\beta$  depuis les endosomes vers le milieu extracellulaire pourrait être en partie responsable de la pathologie amyloïde.

Si le métabolisme de  $\beta$ APP résulte d'une régulation de son trafic vers les différents compartiments cellulaires et les différentes voies de dégradation potentielles, une partie de cette régulation est dépendante de séquences peptidiques sur  $\beta$ APP, permettant son adressage aux différents compartiments cellulaires où elle sera métabolisée, voire dégradée.

Ces séquences spécifiques sont localisées dans la partie C-ter de la  $\beta$ APP (Lai, Sisodia, et Trowbridge 1995 ; Kouchi et al. 1998 ; 1999) et semblent toutes impliquer le lysosome puisqu'aucune d'entre elles ne semblent cibler le protéasome. La  $\beta$ APP possède un motif particulier, YENPTY, nécessaire à son endocytose lorsque cette protéine a atteint la membrane cellulaire (Jiyeon Lee et al. 2008). Cette internalisation nécessite l'intervention des clathrines et de protéines adaptatrices qui vont stabiliser la  $\beta$ APP à la membrane comme Fe65, lui permettant d'être acheminée vers la voie endosome/lysosome pour y être métabolisée par les enzymes impliquées dans la voie amyloïdogène (Fiore et al. 1995). Par des mécanismes de phosphorylation/déphosphorylation, la thréonine 668 et la tyrosine 682 localisées au début de la séquence YENPTY, joueraient un rôle important dans la régulation de la dégradation de  $\beta$ APP par cette voie d'endocytose (Lai, Sisodia, et Trowbridge 1995). En effet, la phosphorylation de ces sites entraînerait un changement de conformation de l'extrémité C-ter de  $\beta$ APP, l'empêchant d'interagir avec Fe65 (nécessaire pour son internalisation) ou d'autres protéines impliquées dans la transduction du signal comme Grb2 (pour Growth factor Receptor-Bound protein 2) ((T. Suzuki et Nakaya 2008 ; Tamayev, Zhou, et D'Adamio 2009). En plus du motif YENPTY, la  $\beta$ APP 695 possède une séquence YKFF qui lui permettrait d'être transloquée dans le lysosome (Lai, Sisodia, et Trowbridge 1995). Ce motif permettrait un accès direct de la  $\beta$ APP au lysosome depuis le TGN lui évitant ainsi de passer par la membrane (Braulke et Bonifacino 2009). Un autre motif, KFERQ, permet aux protéines cytosoliques d'être spécifiquement reconnues par des protéines chaperonnes (CMA pour Chaperone-Mediated Autophagy) dans la voie d'autophagie régulée, favorisant leur adressage au lysosome en vue de leur dégradation (Kouchi et al. 1999). Ainsi, dans la partie C-ter de la  $\beta$ APP, cette séquence, présente sous la forme KFFEQ, limiterait son accès à la membrane en la dégradant précocement, réduisant son entrée dans les 2 voies métaboliques.

Au sein du lysosome, les protéases catabolisant la  $\beta$ APP sont les cathepsines. Elles sont essentielles pour l'élimination des protéines et évitent leur accumulation potentiellement pathologique. Au cours du vieillissement normal, l'activité des cathepsines B, D et E est augmentée dans le cerveau de rats. Seule la cathepsine L est diminuée (Nakanishi et al. 1994 ; 1997). On soupçonne une perturbation progressive dans la balance des dégradations lysosomales responsable de neuropathies liées à l'âge. Le lysosome présente un milieu interne permissif aux nombreuses protéases dont l'activité enzymatique est optimale à pH 3,5 à 5. Cette acidification est possible grâce à des pompes à protons localisées dans leur membrane (Weisz 2003). Une majorité des cathepsines est inefficace à pH neutre (comme les cathepsines B, H et L). Cependant les D, E et S fonctionneraient dans le cytoplasme et même dans le milieu extracellulaire (Bednarski et Lynch 1996 ; Turk, Turk, et Turk 2000). Ainsi, au niveau des plaques séniles, ont été retrouvées les cathepsines D, B et L, indiquant peut-être une fragilisation membranaire du lysosome dans la MA, puisqu'initialement celle-ci est imperméable (H. G. Bernstein et al. 1989 ; Nakamura et al. 1989 ; Cataldo et al. 1991). De plus, au niveau des vésicules de sécrétions, on retrouve les cathepsines B et L et la B cliverait  $\beta$ APP en  $A\beta$  en agissant comme une  $\beta$ -sécrétase (H. Hook et al. 2002 ; V. Hook et al. 2005). Chez la souris, l'inhibition de la cathepsine B réduit le niveau d' $A\beta$  cérébral (V. Y. H. Hook, Kindy, et Hook 2008). Chez l'homme et le rat, la cathepsine D, quant à elle, serait la principale protéase responsable de la clairance d' $A\beta$  au niveau intracellulaire (McDermott et Gibson 1996). Chez des souris déficientes en cathepsine D, un rôle direct en tant que sécrétase est exclu (Saftig et al. 1996). Cependant, comme la cathepsine B, la D peut cliver  $\beta$ APP et générer  $A\beta$  in vitro, agissant à son tour comme une  $\beta$ -sécrétase (Chevallier et al. 1997 ; Sadik et al. 1999 ; Di Domenico, Tramutola, et Perluigi 2016 ; Suire et al. 2020 ; Gallwitz et al. 2022).

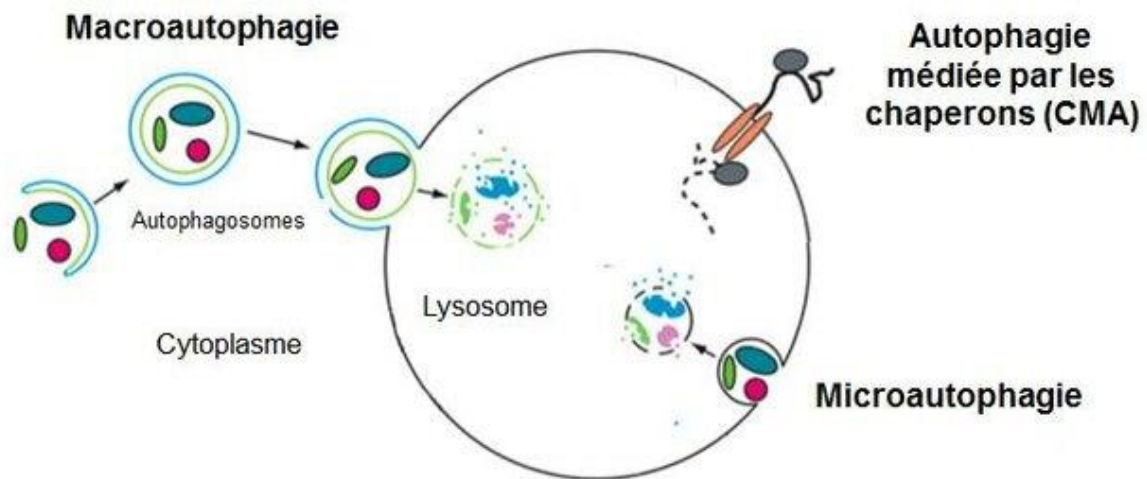
#### a- Protéasome :

Dans la cellule, le protéasome est la voie majoritaire de dégradation des protéines. Ses cibles doivent posséder une séquence spécifique qui leur permettra d'être ubiquitinylées en partie N-ter par l'ubiquitine ligase et ainsi être dégradées (Lehman 2009). Cependant, aucun motif consensus n'est présent sur  $\beta$ APP même si le protéasome interviendrait dans le processus physiopathologique de la MA (Marambaud et al. 1997 ; Nunan et al. 2001 ; Morel et al. 2013 ; Evrard et al. 2018).  $\beta$ APP peut aussi être ubiquitinylée in vitro (Kaneko et al. 2010 ; Watanabe et al. 2012).

#### b- Autophagie :

Au-delà de ces mécanismes de dégradation spécifiques, il existe dans la cellule des mécanismes de dégradation généraux. L'autophagie est une voie importante de

dégradation dans la cellule. Outre son rôle dans la mort cellulaire programmée, l'autophagie existe dans la cellule saine essentiellement pour son rôle dans la dégradation des surplus de protéines ou dans l'élimination d'organites endommagés (Klionsky et al. 2011). Il existe en tout 3 formes d'autophagies (*Figure 13*) : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par des protéines chaperonnes ou CMA.



*Figure 13 : Les 3 formes d'autophagie (d'après Chalvon Demersay, 2016)*

L'élimination des protéines non dégradées par le protéasome, mais aussi la dégradation d'organelles sont réalisées par la macroautophagie. Pour ce faire, une double membrane, qui provient des différents compartiments cellulaires (RE, appareil de Golgi, mitochondrie (Axe et al. 2008 ; Yen et al. 2010)) et est appelée phagophore, va s'allonger et séquestrer des protéines cytoplasmiques ou des organelles puis se refermer formant un autophagosome. Ce dernier fusionne avec le lysosome formant une vésicule autophagique acide qui relargue le corps autophagique, constitué de la membrane interne de l'autophagosome et de son contenu, dans le lumen pour ensuite le dégrader par des hydrolases vacuolaires (K. Suzuki et al. 2007). C'est un complexe de protéines membranaires Atg (pour Autophagy-related protein) qui régule le bourgeonnement et la formation de l'autophagosome. Si l'on bloque sa formation, cela entraîne l'accumulation de toutes les protéines empreintant cette voie dont les protéines tau et  $\beta$ APP, ou les catabolites C99 et A $\beta$ .

La microautophagie débute par la formation de cargos de protéines prêtes à être dégradées et reste indépendante de l'autophagosome. Ces cargos seront dégradés par des hydrolases vacuolaires (Kunz, Schwarz, et Mayer 2004) suite à leur invagination dans la vacuole autophagique. Il existe peu de données disponibles l'impliquant dans la MA.

Pour qu'elle soit reconnue par un complexe de protéines chaperonnes spécifique de la CMA, dont Hsc70 (pour Heat Shock 70), la protéine cible doit porter un motif KFERQ permettant son acheminement au lysosome (Massey, Zhang, et Cuervo 2006). A son arrivée, un récepteur de la membrane lysosomale, Lamp2a (pour Lysosome-associated membrane protein type 2A), reconnaît le complexe protéique ce qui va permettre la translocation de la protéine cible dans le lysosome où elle sera dégradée (Dice 2007 ; Bandyopadhyay et al. 2010). KFERQ est présent sur tau et l' $\alpha$ -synucléine, toutes 2 dégradées par la CMA (Vogiatzi et al. 2008 ; Yipeng Wang et al. 2009). Même si cette voie d'autophagie concerne majoritairement les protéines cytosoliques (Massey, Zhang, et Cuervo 2006), sur  $\beta$ APP il existe une séquence KFFEQ semblable au motif KFERQ, lui permettant potentiellement d'être reconnue et dégradée par la CMA (Kouchi et al. 1999).

### c- Métabolisme de $\beta$ APP et production d' $A\beta$ au niveau des mitochondries :

Les fonctions mitochondriales peuvent réguler le métabolisme de  $\beta$ APP de 2 manières distinctes. Premièrement, dans les membranes mitochondriales,  $\beta$ APP pourrait se fixer et former un complexe avec les translocases TOM (pour Translocase of the Outer Mitochondrial Membrane) et TIM (pour Translocase of the Inner Mitochondrial Membrane) (Figure 14). En dehors de la mitochondrie, la partie C-ter de  $\beta$ APP dépasserait, puis à la suite de son insertion dans la membrane externe mitochondriale (Anandatheerthavarada et al. 2003 ; Pavlov et al. 2011), l' $\alpha$ - et la  $\beta$ -sécrétase cliveraient cette partie externe laissant dans la membrane mitochondriale interne le fragment N-ter de  $\beta$ APP et le fragment C-ter dans la membrane externe. On y retrouve aussi la  $\gamma$ -sécrétase qui cliverait le fragment C-ter restant en peptide  $A\beta$  au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Pavlov et al. 2011).

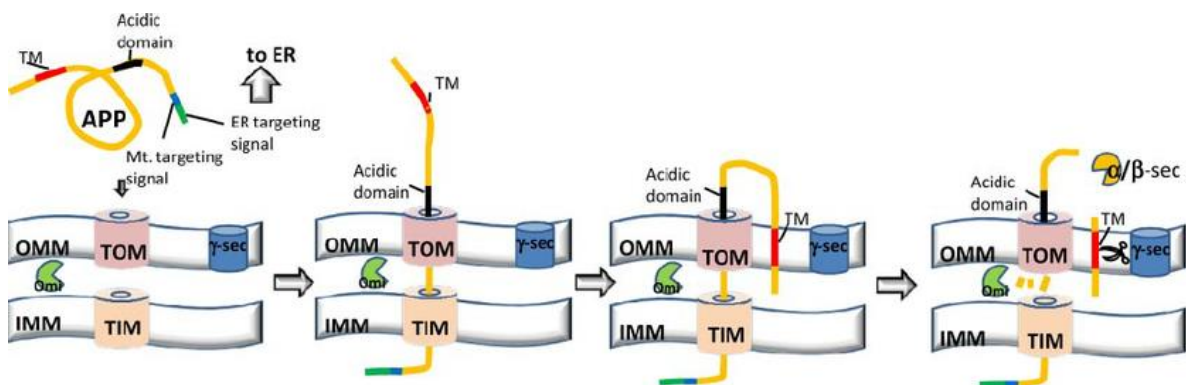


Figure 14 : Le métabolisme de la protéine  $\beta$ APP au niveau des mitochondries (d'après Pavlov et al. 2011)



La deuxième régulation possible se passe à l'intérieur de la mitochondrie où le peptide A $\beta$  est directement transloqué à l'aide du complexe TOM (Pinho, Teixeira, et Glaser 2014). Ces translocations directes se feraient par des zones de contact entre le RE et les mitochondries nommées MAM (pour Mitochondria Associated endoplasmic reticulum Membranes) facilitant ainsi le clivage par  $\gamma$ -sécrétase (Area-Gomez et al. 2009). A l'intérieur de la matrice mitochondriale, le peptide A $\beta$  s'accumule mais sera dégradé par la métalloprotéase PreP (pour Presequence Protease) (Mzhavia et al. 1999 ; Falkevall et al. 2006). En effet, pour empêcher son agrégation, PreP clive A $\beta$  dans sa partie C-ter hydrophobe. Chez les patients Alzheimer, dans le lobe temporal, une des zones les plus affectées par l'accumulation d'A $\beta$ , l'activité de PreP est diminuée (Pinho, Teixeira, et Glaser 2014). Cette baisse d'activité ne serait pas due à une quantité de PreP réduite, mais à l'accumulation progressive de radicaux libres ou ROS (pour Reactive Oxygen Species) (Alikhani et al. 2011), inhibant son activité in vitro (Filipe Teixeira et al. 2012). En effet, la production et la sécrétion d'A $\beta$  favoriseraient son accumulation dans les mitochondries et donc la dégénérescence synaptique suite à une production de radicaux libres inhibant la protéine PreP (Calkins et al. 2011 ; Manczak, Calkins, et Reddy 2011). C'est pourquoi, explorer de nouvelles voies de régulation et/ou de dégradation de  $\beta$ APP deviendrait potentiellement une approche possible pour mieux appréhender le processus physiopathologique de la MA.

## D-Le trafic de la protéine $\beta$ APP :

La protéine  $\beta$ APP est synthétisée dans le RE et incorporée à la membrane simultanément. Elle subit ensuite un processus de maturation lors de son passage dans le RE et à travers l'appareil de Golgi pour atteindre le TGN, là où la  $\beta$ APP serait la plus concentrée dans les neurones à l'état basal. Une fois au niveau du TGN, servant de station de triage des protéines matures, la protéine  $\beta$ APP est empaquetée dans des vésicules de la voie de sécrétion constitutive. Par cette voie, elle atteint la membrane plasmique, mais ne semble pas y demeurer longtemps, la protéine de surface ne représente qu'environ 10% de l'expression totale (Thinakaran et Koo 2008). La protéine  $\beta$ APP peut alors être clivée dans la voie non-amyloïdogène ou encore internalisée via des vésicules de clathrine vers la voie endosomale (Nordstedt et al. 1993). Au niveau des endosomes précoces,  $\beta$ APP peut emprunter 4 voies distinctes : (i)  $\beta$ APP peut évoluer dans la voie endosomale vers le lysosome où une portion de protéines est dégradée (De Strooper et Annaert 2000 ; Lorenzen et al. 2010 ; Yun-wu Zhang et al. 2011) ; (ii)  $\beta$ APP peut aussi être recyclée à la membrane plasmique via des vésicules de recyclage ; (iii)  $\beta$ APP peut aussi être transportée de façon rétrograde à partir des endosomes précoces vers le TGN et enfin, (iv)  $\beta$ APP

peut aussi subir le clivage amyloïdogène au niveau des endosomes tardifs. Les fragments produits sont ensuite sécrétés dans le milieu extracellulaire ou dégradés dans le lysosome (Peraus, Masters, et Beyreuther 1997). La figure suivante (Figure 15) résume l'ensemble du trafic intracellulaire de la protéine  $\beta$ APP (Turner et al. 2003 ; Tang 2009). De façon générale, la demi-vie de  $\beta$ APP serait d'environ 45 à 65 minutes dans la plupart des types cellulaires (Selkoe 2001).

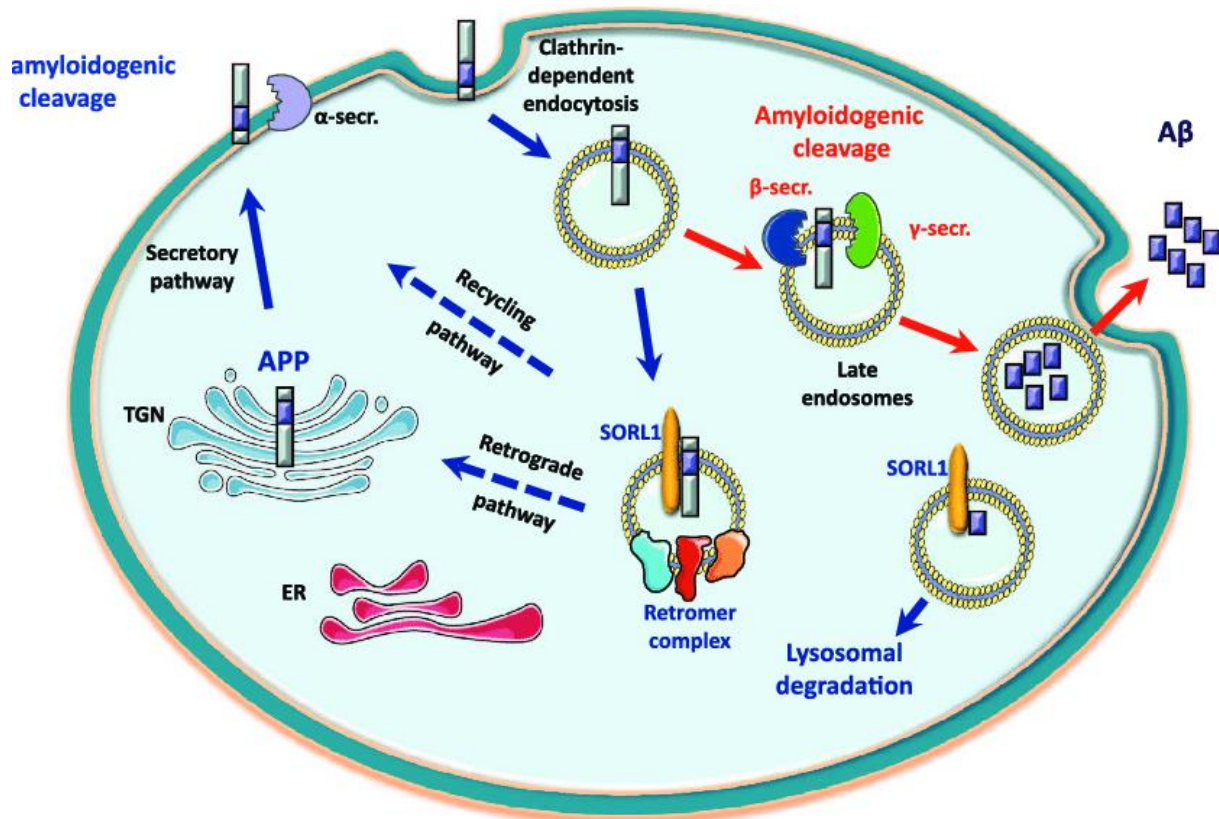


Figure 15 : Le trafic de la protéine  $\beta$ APP (d'après Campion et al, 2016)

Une fraction des protéines  $\beta$ APP qui échappe aux protéolyse intracellulaires parvient jusqu'à la membrane et est réinternalisée par endocytose pour accéder aux compartiments endosomaux et lysosomaux où les activités  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase sont également présentes (Checler 1995).

Plusieurs protéines sont impliquées dans le transport intracellulaire de  $\beta$ APP. En effet, sa queue cytoplasmique contient entre autres un motif YENPTY (Perez et al. 1999) responsable de son internalisation, qui interagit avec plusieurs protéines adaptatrices impliquées dans le trafic intracellulaire. Ainsi, les résidus tyrosines phosphorylés dans ce motif et les régions de part et d'autre permettent à  $\beta$ APP d'interagir avec les domaines PTB (pour Phosphotyrosin Binding) ou SH2 (pour Src-Homology 2) des protéines adaptatrices impliquées dans son trafic. Parmi ces protéines adaptatrices impliquées dans l'exocytose ou l'internalisation de  $\beta$ APP, on

dénote entre autres, le complexe de protéines adaptatrices de clathrine AP-2 (pour Adaptor Protein-2), certains membres de la famille de protéines Mints/X11, les protéines Dab1/Dab2 (pour Disabled), la famille de protéines Fe65 ainsi que les protéines Jip (pour JNK-interacting protein) (Zhi, Chia, et Gleeson 2011). De plus,  $\beta$ APP interagit aussi via ce même motif avec la protéine adaptatrice SNX17 (pour Sorting Nexin 17) qui intervient plutôt dans le trafic de  $\beta$ APP au niveau des endosomes précoces et de son recyclage à la membrane (Jiyeon Lee et al. 2008). Dans tous les cas, il a été démontré que ces protéines interagissant avec  $\beta$ APP peuvent avoir un effet sur son trafic et la production d'A $\beta$ .

De façon plus indirecte, certaines protéines adaptatrices de clathrine telles que les GGA (pour Golgi-localized,  $\gamma$ -ear containing, ADP-ribosylation factor binding) impliquées dans le transport entre le TGN et les endosomes, ainsi que certains membres du complexe rétromère (S. A. Small et al. 2005 ; Sullivan et al. 2011), intervenant dans le transport rétrograde entre les endosomes et le TGN, influencent aussi le trafic intracellulaire de la  $\beta$ APP et son clivage en A $\beta$ . Ensuite, le trafic de la  $\beta$ APP est aussi modulé par son interaction avec des récepteurs membranaires qui sont en partie responsables des effets indirects des protéines GGA et rétromères observés sur la  $\beta$ APP. Ainsi, la  $\beta$ APP est capable d'interagir avec certains membres de la famille des récepteurs de lipoprotéine de faible densité LDLR (pour Low Density Lipo protein Receptor) comme LRP1, LRP1B, ApoER2 (pour Apolipoprotein E receptor 2 ou LRP8) et SorLA, qui a fait l'objet de ma thèse et dont je développerai la fonction et son interaction avec  $\beta$ APP plus loin dans un chapitre dédié (Cam et Bu 2006 ; Marzolo et Bu 2009). Finalement, la phosphorylation de certains résidus sérines/thréonines dans la queue cytoplasmique de la  $\beta$ APP participe à son trafic soit en stimulant sa sortie du TGN et son exocytose ou encore son transport rétrograde des endosomes vers le TGN (da Cruz e Silva et da Cruz e Silva 2003).

#### a- Le complexe rétromère :

Les protéines adaptatrices GGA ainsi que les protéines du complexe rétromère jouent un rôle important dans le trafic intracellulaire non seulement de  $\beta$ APP, mais aussi de BACE1, responsable du clivage  $\beta$  de  $\beta$ APP et de la production d'A $\beta$  au niveau des endosomes. De plus, certains de ces acteurs dans le trafic de  $\beta$ APP et de BACE1 pourraient être impliqués dans la pathogénèse de la MA, en favorisant la production d'A $\beta$ .

Le complexe rétromère à la surface cytosolique des endosomes est impliqué dans le transport rétrograde des endosomes vers le TGN de certaines protéines ou récepteurs cargo transmembranaires de type I. Les rétromères existent sous la forme d'un complexe hétéropentamérique constitué d'un dimère de protéines SNX et d'un

trimère composé de Vps26, Vps29 et Vps35 (pour Vacuolar Protein Sorting). Les dimères de SNX sont composés de différentes combinaisons non définies des SNX1, SNX2, SNX5 et SNX6. Vps35 forme le cœur du complexe, assurant le lien entre le récepteur cargo ou la protéine transportée et les autres membres du complexe rétromère (J. S. Bonifacino et Hurley 2008). Les rétromères interagissent avec une famille de récepteurs contenant le domaine Vps10p comprenant Sortiline, SorCS1, SorCS2, SorCS3 (pour Sortilin Related Vps10 domain Containing Receptor) et SorLA. Les rétromères modulent le trafic rétrograde de  $\beta$ APP directement ou indirectement via certains récepteurs capables de lier et d'affecter le trafic de la protéine comme SorLA (S. A. Small et Gandy 2006) ou SorCS1 (Lane et al. 2010). De plus, les rétromères sont aussi impliqués dans le transport rétrograde de BACE1 de façon directe ou indirecte via, notamment, le récepteur SorLA (Spoelgen et al. 2006) ou la Sortiline (Finan, Okada, et Kim 2011). Ainsi, en participant au transport rétrograde de la  $\beta$ APP et de BACE1, les rétromères permettent de restreindre le clivage amyloïdogène et la production d'A $\beta$  en prévenant la présence de la  $\beta$ APP et de BACE1 dans les endosomes, où le clivage  $\beta$  s'effectue majoritairement. Plus précisément, Vps35 et SNX6 régulent directement le trafic de la  $\beta$ APP et de BACE1, respectivement. Vps35 module positivement la phosphorylation de  $\beta$ APP, essentielle pour son transport rétrograde vers le TGN, ainsi que sa demi-vie, puisque la phosphorylation de  $\beta$ APP réduit son trafic vers le lysosome (Vieira et al. 2010). SNX6 est présent au sein d'un complexe avec BACE1 et module plutôt ses niveaux intracellulaires et son transport rétrograde, puisqu'une réduction de SNX6 dans les neurones augmente le niveau basal de BACE1 ainsi que la production d'A $\beta$  (Okada et al. 2010). Le trafic de BACE1 est aussi affecté par Vps26, car sa réduction entraîne une relocalisation de BACE1 au niveau de structures en périphéries cellulaires (X. He et al. 2005). Enfin, il est connu que le complexe rétromère est altéré dans le cerveau des patients atteints de la MA. En effet, une réduction des niveaux protéiques de Vps26 et Vps35 a été observée, suggérant que les rétromères participent aussi à la pathogénèse de la MA (S. A. Small 2008). Cette réduction aurait pour effets d'augmenter le temps de passage de  $\beta$ APP dans les endosomes en réduisant le transport rétrograde de  $\beta$ APP directement ou indirectement, et pourrait aussi favoriser l'accès de BACE1 à la  $\beta$ APP ce qui se traduirait par l'augmentation de la production d'A $\beta$ . Finalement, il a été démontré que l'altération de l'expression de Vps26 chez des souris entraîne des dysfonctions synaptiques au niveau de l'hippocampe, une augmentation de la production d'A $\beta$  et de la neurodégénérescence (Muhammad et al. 2008).

#### b- Les récepteurs de lipoprotéines de faibles densités :

La famille des récepteurs de lipoprotéines de faibles densités LDLR est constituée de protéines transmembranaires de type I qui se caractérisent entre autres par la

capacité de tous ses membres à lier l'ApoE, impliquée dans le transport du cholestérol, et par l'homologie de certains domaines structuraux ou fonctionnels dans leur séquence. Cette famille inclut 10 membres soient LRP1, LRP1B, Megalin (LRP2), LDLR, VLDLR (pour Very Low Density Lipoprotein Receptor), ApoER2, LRP4 (ou MEGF7), LRP5, LRP6 et SorLA, en plus d'une nouvelle sous-famille plus récemment découverte et composée de 4 membres distincts LRP3, LRP12, LRP10 et Lrad3 (pour LDLR class A domain-containing protein 3).

La grande famille des LDLR joue plusieurs rôles importants dans la cellule, que ce soit en intervenant dans le métabolisme du cholestérol via le transport de l'ApoE, l'endocytose, la signalisation intracellulaire (survie cellulaire, apoptose), la plasticité synaptique ou le trafic intracellulaire (Y. Li, Cam, et Bu 2001 ; Battle, Maher, et McCormick 2003 ; May et al. 2007). Puisque les LDLR constituent la classe majeure de récepteurs de l'ApoE, il est intéressant de se rappeler que l'ApoE existe sous 3 isoformes, soient  $e2$ ,  $e3$  et  $e4$  et que la présence de l'allèle  $e4$  représente un facteur de risque génétique pour la MA, corrélant avec une augmentation de l'A $\beta$  intraneuronale (Christensen et al. 2010). De plus, tous les membres des LDLR semblent exprimés au niveau du cerveau et particulièrement dans les zones présentant une accumulation de l'A $\beta$  dans la MA. Parmi les récepteurs de la famille des LDLR, les récepteurs LRP1, LRP1B, ApoER2 et SorLA ont été identifiés comme partenaires d'interaction de la protéine  $\beta$ APP capables de moduler son trafic intracellulaire. Ainsi ces récepteurs interviennent de diverses manières dans le clivage de  $\beta$ APP et la production d'A $\beta$ . De plus, certains seraient même reliés génétiquement à la MA (Andersen et Willnow 2006 ; Pietrzik et Jaeger 2008).

Des études GWAS ont décrits *SORL1* comme un gène de susceptibilité des formes sporadiques de la MA (Rogaeva et al. 2007 ; Jean-Charles Lambert et al. 2013). Son expression est diminuée dans les cerveaux de patients (Scherzer et al. 2004). Chez la souris, une surexpression de SorLA (la protéine issue de *SORL1*) entraîne une diminution de la quantité d'A $\beta$  tandis que son absence produit l'inverse (Andersen et al. 2005 ; Offe et al. 2006). SorLA est une protéine transmembranaire de 250 kDa (H. Yamazaki et al. 1996) impliquée dans le contrôle du trafic intracellulaire de  $\beta$ APP (Herskowitz et al. 2012 ; Fjorback et al. 2012). Cette protéine agirait entre le TGN et la voie endosome/lysosome directement sur les acteurs du trafic antérograde et rétrograde de  $\beta$ APP (comme AP1 (pour Activating Protein-1) ou GGA). Ainsi, sans passer par la voie de sécrétion, une quantité de  $\beta$ APP nouvellement générée serait séquestrée par SorLA dans le TGN et/ou directement dirigée vers la voie de dégradation endosome/lysosome (Nielsen et al. 2007 ; Schmidt et al. 2012). SorLA empêcherait donc la formation d'homodimères de  $\beta$ APP (les substrats préférentiels des sécrétases) en la séquestrant dans le TGN, ce qui limiterait l'apport de  $\beta$ APP aux 2 voies métaboliques. Enfin, l'A $\beta$  nouvellement synthétisé serait également dirigé par SorLA vers la voie de dégradation lysosomale (Caglayan et al. 2014). Dans le cadre de la MA, l'expression réduite de SorLA entraînerait une baisse de la séquestration

de  $\beta$ APP dans le TGN et une baisse de sa dégradation dans la voie lysosomale, favorisant ainsi la voie amyloïdogène. Cette baisse d'expression conduit aussi à l'accumulation d'A $\beta$  dans des corps multi-vésiculaires (MVB), fusionnant à la membrane plasmique et formant des exosomes dans le milieu extracellulaire ce qui aggrave l'accumulation progressive du peptide A $\beta$  et pourrait contribuer à sa diffusion (Rajendran et al. 2006 ; Sharples et al. 2008). Au laboratoire, nous avons montré que SorLA n'intéragirait pas ou peu avec les dimères de C99 qui seraient déroutés du TGN aux endosomes précoces (Lauritzen et al. 2019).

L'endocytose très rapide du récepteur LRP1 favoriserait l'endocytose de  $\beta$ APP vers les endosomes et donc la production d'A $\beta$  alors que l'internalisation plus lente des récepteurs LRP1B et ApoER2 retiendrait la  $\beta$ APP à la surface. Bien que le LRP1B favoriserait l'accessibilité de la  $\beta$ APP à la voie de clivage  $\alpha$ , réduisant ainsi la production d'A $\beta$ , l'ApoER2 favoriserait le clivage  $\alpha$ , mais des effets divergents seraient aussi observés en fonction de son interaction avec ses différents ligands et protéines adaptatrices modulant son trafic. SorLA, effectuant un cycle entre le TGN et les endosomes, pourrait favoriser le transport rétrograde de  $\beta$ APP des endosomes vers le TGN ou induire une rétention de la  $\beta$ APP au niveau du TGN, réduisant son clivage  $\beta$  aux endosomes et le relargage d'A $\beta$ . Les protéines adaptatrices Dab2 et SNX17 influenceraient aussi directement le trafic de  $\beta$ APP.

## 5-LE PEPTIDE AMYLOÏDE A $\beta$

Le peptide A $\beta$ , issu du clivage de son précurseur  $\beta$ APP par la  $\beta$ - et la  $\gamma$ -secrétase, est produit lors du métabolisme normal et jouerait également un rôle physiologique. Dans le cerveau, il peut être détecté sous forme soluble ou insoluble. Chez les individus sains, 90% du peptide A $\beta$  est sous forme soluble et 5% sous forme insoluble (X. Sun, Chen, et Wang 2015). Selon la topologie de  $\beta$ APP dans une membrane cellulaire ou une membrane d'organite, le peptide A $\beta$  résultant peut être libéré dans le milieu extracellulaire ou de manière luminale dans un compartiment intracellulaire, respectivement. Le peptide amyloïde A $\beta$ , d'un poids moléculaire de 4 kDa a été identifié, purifié et séquencé parallèlement par 2 équipes. D'une part, Glenner et Wong en 1984 ont isolé le peptide A $\beta$  à partir de dépôts amyloïdes vasculaires de patients atteints de la MA (Glenner et Wong 1984). D'autre part, l'équipe de Colin Masters en 1985 a isolé ce même peptide A $\beta$  à partir de plaques séniles issues de patients Alzheimer et de patients atteints du syndrome de Down (Masters et al. 1985). Les premiers anticorps dirigés contre le peptide A $\beta$  ont rapidement été produits et utilisés pour marquer de façon spécifique les cerveaux de patients atteints de la MA. Le peptide amyloïde A $\beta$  est en effet le composant majeur des plaques séniles et près de 70% des protéines composant une plaque sénile possèdent la séquence du peptide A $\beta$  (Miller et al. 1993). Ces premières

observations mettant le peptide A $\beta$  au centre des lésions pathologiques de la MA, mais aussi les premières mutations sur le gène *APP* en 1991, ont conduit Hardy et Higgins à émettre l'hypothèse de la cascade amyloïde, décrite ci-dessus, selon laquelle l'accumulation et l'agrégation du peptide A $\beta$  serait la principale cause des dysfonctionnements neuropathologiques rencontrés dans la MA (J. A. Hardy et Higgins 1992). Depuis les années 1990, de nombreuses études portant sur le peptide amyloïde A $\beta$ , sur sa structure et sa fonction, ont conforté cette hypothèse.

## A- Les différentes espèces de peptide amyloïde A $\beta$ :

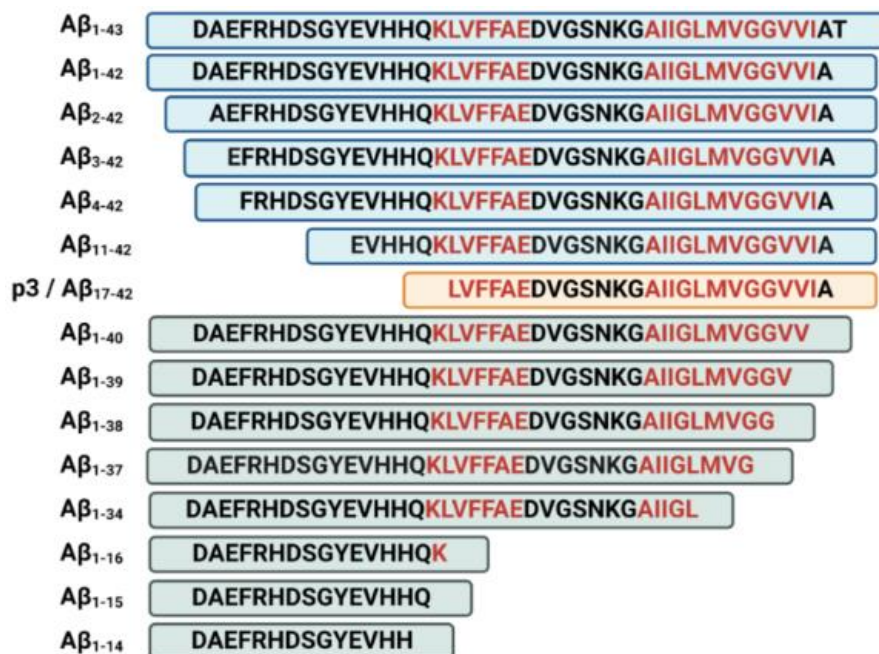


Figure 16 : Quelques exemples de peptides amyloïdes A $\beta$  parmi plus de 100 variants différents (d'après Bush et al, 2002)

Différentes espèces de peptide amyloïde (Figure 16) varient selon leur longueur qui influence sur leurs propriétés biochimiques. Outre les formes majoritairement produites A $\beta$  1-40 et A $\beta$  1-42, des espèces de différentes longueurs et des espèces tronquées en N-ter sont décrites (Iwatsubo et al. 1996 ; Thal et al. 1999 ; Takeda et al. 2004 ; Dunys, Valverde, et Checler 2018). On a pu aussi détecter des formes de peptides A $\beta$  tronquées en leurs régions C-ter (A $\beta$  34, 37, 38 ou 39).

Comme cela a été décrit ci-dessus, le clivage de la protéine  $\beta$ APP par la  $\gamma$ -sécrétase est séquentiel (Qi-Takahara et al. 2005 ; Kakuda et al. 2006 ; Sosuke Yagishita, Futai, et Ishiura 2008). Le premier clivage est effectué près du côté cytoplasmique de la membrane. Ce clivage libère des longs peptides A $\beta$  (Gu et al. 2001 ; Andreas



Weidemann et al. 2002) qui seraient ensuite raccourcis par des clivages successifs qui diminueraient l'hydrophobicité du peptide et augmenteraient la probabilité de sa libération dans l'environnement extracellulaire (Takami et al. 2009). Les propriétés biophysiques du peptide A $\beta$  varient selon sa longueur. La forme 42 est plus hydrophobe que les autres, elle tend à s'agréger plus fortement (Burdick et al. 1992 ; Joseph T. Jarrett, Berger, et Lansbury 1993 ; J. T. Jarrett et Lansbury 1993). Plutôt que les niveaux totaux de peptide A $\beta$ , c'est le ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 qui influence fortement les effets biologiques du mélange de peptides A $\beta$  (Kuperstein et al. 2010). Le peptide amyloïde synthétisé sous forme monomérique soluble s'agrège rapidement en oligomères, protofibrilles puis fibrilles. Certaines de ces formes sont plus toxiques que d'autres.

a- Les formes tronquées en N-ter du peptide amyloïde A $\beta$  :

#### 1- A $\beta$ 2-x :

A $\beta$  2-42 est présent à la fois dans le LCS et dans les homogénats de cerveaux humains. On détecte plus d'A $\beta$  2-42 chez des patients atteints de MA que chez les personnes saines (Maler et al. 2007). Une déficience en PS1 dans un modèle murin n'affecte pas la production de ce fragment à l'inverse de l'A $\beta$  total. Ainsi la formation de l'A $\beta$  2-42 est indépendante de la  $\gamma$ -sécrétase et serait due à une autre enzyme. Par la suite, d'autres publications ont confirmé la présence des formes A $\beta$  2-x avec une baisse dans le LCS (Bibl, Gallus, Welge, Lehmann, et al. 2012 ; Bibl, Gallus, Welge, Esselmann, et Wiltfang 2012 ; Bibl, Gallus, Welge, Esselmann, Wolf, et al. 2012 ; Bibl et al. 2018) et une augmentation dans les homogénats de cerveaux (Savastano et al. 2016). Cette diminution d'A $\beta$  2-x semble être spécifique de la MA et absente dans les démences fronto-temporale (FTD). Plus récemment, la présence d'A $\beta$  2-x a été décrite dans le core des plaques et dans les vaisseaux de 2 modèles murins ainsi que dans des cas sporadiques de MA. Pour trouver l'enzyme capable de libérer l'aspartyl 1 du peptide A $\beta$ , des équipes, dont la notre, ont travaillé avec des inhibiteurs de BACE, d'APA (pour AminoPeptidase A) (Sevalle et al. 2009) ou des souris invalidées pour la Meprin  $\beta$  (porteuse d'une activité de type  $\beta$ -sécétase) (Scharfenberg et al. 2019). On constate que l'inhibition de BACE ne modifie aucunement la formation d'A $\beta$  2-x, alors que celle d'APA et de Meprin  $\beta$  montre une augmentation d'A $\beta$  total (Schlenzig et al. 2018). De manière intéressante, on observe aussi que la Meprin  $\beta$  clive différemment selon l'acide aminé situé en amont de l'aspartyl. Ainsi, la leucine présente dans la double mutation suédoise empêche la Meprin  $\beta$  de générer la forme A $\beta$  2-40. Les formes A $\beta$  tronquées affecteraient la toxicité engendrée par la caspase 3. Une augmentation d'A $\beta$  total induirait un effet protecteur pour la cellule (Sevalle et al. 2009).



## 2- A $\beta$ 4-x :

A $\beta$  4-x est très abondant dans les cerveaux de patients Alzheimer. Il est localisé dans le core des plaques, en intra-neuronale et dans les AAC. Ce fragment n'est cependant pas retrouvé dans les plaques diffuses, dans d'autres maladies neurodégénératives et serait produit de manière précoce (Y. Bouter et al. 2013). Pour étudier ce peptide, un modèle murin Tg4-42 a été développé (Dietrich et al. 2018 ; C. Bouter et Bouter 2019). Les souris développent des déficits cognitifs et moteurs (Wagner et al. 2019) avec une accumulation d'A $\beta$  en plaques, une diminution de la neurogénèse dans le gyrus dentelé et dans la zone sous granulaire (SGZ), une diminution de l'activité physique (sensation d'apathie) et une augmentation de la micro/astroglie (Wirths et al. 2017). Le A $\beta$  4-42 peut former un canal ionique stable dans les bicouches lipidiques et engendrerait une neurotoxicité (Karkisaval et al. 2020). De plus il existe une interaction entre A $\beta$  4-42 et le cuivre Cu<sup>2+</sup> (Stefaniak et Bal 2019). L'A $\beta$  4-x se fixerait à cet ion métallique dans le cerveau et maintiendrait la neurotransmission. Il est également suggéré que les formes 3/4-x d'A $\beta$  soient impliquées dans la fibrillation.

## 3- A $\beta$ 11-x et A $\beta$ 17-x :

Les catabolites A $\beta$  11-x et A $\beta$  17-x sont générés par l'action concertée des  $\alpha$  et  $\beta$ -sécrétases d'une part et de la  $\gamma$ -sécrétases d'autre part (T. C. Saido et al. 1996). De manière générale, l'A $\beta$  17-x (p3) a été rarement étudié et ne montre pas de toxicité. En revanche, pour A $\beta$  11-x, plusieurs équipes ont identifié BACE1 comme étant l'enzyme formant ce fragment (K. Liu et al. 2006). A l'aide des techniques d'immunoempreintes et à la synthèse d'anticorps dirigés contre différentes formes d'A $\beta$  tronqués en sa région N-ter, les formes A $\beta$  3, 11 et 17-x ont été détectées dans le surnageant de cellules HEK-293 APPWT surexprimant BACE1, dans les extractions de différentes aires cérébrales de patients Alzheimer et dans le LCS (Abraham et al. 2013 ; Ranaldi et al. 2013). Ces résultats indiquent un potentiel effet toxique de ces formes d'A $\beta$  et particulièrement l'A $\beta$  11-42 dans la MA. En effet, dans différentes lignées cellulaires, une augmentation accrue des formes A $\beta$  11-42 est observée par des approches de mutations FAD sur  $\beta$ APP ou de surexpression de BACE (E. B. Lee et al. 2003). Les formes A $\beta$  11-42 représentent un pourcentage identique à celui de l'A $\beta$  1-42 (environ 18%) dans les plaques séniles chez des patients Alzheimer. Dans le LCS ou dans des échantillons humains de MA ou MCI en post-mortem, les résultats révèlent une forte présence d'A $\beta$  11-42 dans le lobe temporal supérieur des patients Alzheimer et une diminution dans le LCS des MCI (K. Liu et al. 2006).

La particularité d'A $\beta$  11-42 est sa capacité de fixation avec les autres formes d'A $\beta$  ou avec le cuivre Cu<sup>2+</sup> (K. Ancolio et al. 1999 ; Ranaldi et al. 2013). En effet une forte

association entre A $\beta$  11-40/42 et le cuivre a été observée. L'histidine 13 du peptide A $\beta$  procure un motif « NH<sub>2</sub>-XxxXxxHis » proche de l'albumine, le substrat naturel du cuivre. Lors de l'ajout d'un chélateur du cuivre (clioquinol), une amélioration de la toxicité et de la charge en plaques est visible dans des modèles de MA (Barritt et Viles 2015 ; Barritt, Younan, et Viles 2017). Une étude constate que lors de la formation des fibres A $\beta$  1-x, l'A $\beta$  11-40 interagit exclusivement avec l'A $\beta$  1-40 et accélère la formation fibrillaire. Cette différence d'efficacité d'agrégation entre l'A $\beta$  11-40 et l'A $\beta$  1-x est sans doute due à la conformation en U ou en S du peptide A $\beta$  1-x, produite par le pont salin.

#### b- Les formes tronquées du peptide amyloïde A $\beta$ en C-ter :

##### 1- A $\beta$ x-34 :

Le rôle physiologique et pathologique du peptide A $\beta$  34 n'a pas été jusqu'ici découvert. C'est au moyen de la spectrométrie de masse qu'il a été identifié dans le LCS de patients Alzheimer (Caillava et al. 2014 ; Cabrera et al. 2018 ; Dunys, Valverde, et Checler 2018). Cependant, des niveaux et une activité modifiés de BACE1, l'enzyme responsable du clivage initial de  $\beta$ APP générant le peptide A $\beta$ , ont un impact sur la dégradation d'A $\beta$  40 et 42 en un intermédiaire commun, A $\beta$  34 qui représenterait un marqueur de la clairance amyloïde (Liebsch et al. 2019).

##### 2- A $\beta$ x-37, 38 et 39 :

Ils sont présents dans le LCS de patients Alzheimer (Reinert et al. 2016). L'A $\beta$  38 semble même être la seconde forme d'A $\beta$  la plus présente après A $\beta$  40 avec une concentration proche de celle d'A $\beta$  42. Au niveau cérébral, A $\beta$  38 se retrouve principalement dans les parois de vaisseaux de personnes atteintes d'AAC mais absent dans les plaques séniles (P. Mattson et al. 1992 ; Yoshimoto et al. 1995 ; Paik et al. 1998). Dans le cas d'A $\beta$  37 et A $\beta$  39, les marquages immunohistologiques dans le cerveau de patients Alzheimer, pour les formes familiales ou sporadiques, détectent une forte présence de ces fragments dans les vaisseaux méningés et parenchymateux. Dans les formes familiales, il est présent également dans les plaques séniles (Wiltfang et al. 2002). La production de ces fragments correspond à un clivage successif par la  $\gamma$ -sécrétase, en enlevant des tripeptides ou en libérant le peptide GVVIA dans la région C-ter d'A $\beta$  40/42. La production d'A $\beta$  38 est influencée par des drogues NSAID (pour Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs) telle que l'ibuprofène (Weggen et al. 2001). En effet, l'application de ces traitements dans des cellules CHO (pour Chinese Hamster Ovary) ou HEK-293 diminue la production d'A $\beta$

42 en favorisant la présence d'A $\beta$  38. Les drogues modèleraient l'activité  $\gamma$ -sécrétase sans modifier l'activité cyclo-oxygénase et la voie Notch. Il est intéressant de noter que ces formes tronquées en C-ter sont moins agrégantes in vitro, moins synaptotoxiques dans les coupes hippocampiques et n'altèrent pas la toxicité et la fonction locomotrice des modèles drosophiles (B. D. Moore et al. 2018).

c- La forme particulière du peptide amyloïde A $\beta$  Pyroglutamate 3-x :

Le fragment A $\beta$  pE3-x pourrait constituer un des facteurs précoces de l'étiologie de la MA. Son identification notamment dans les plaques séniles date des années 1990 (Mori et al. 1992 ; Takaomi C Saido et al. 1995). L'A $\beta$  pE3-x est le résultat d'une succession de clivages enzymatiques sur la  $\beta$ APP avec l'intervention de la  $\beta$ - et de la  $\gamma$ -sécrétase puis sur A $\beta$  42 par la Meprin  $\beta$ , des aminopeptidases (APA), des dipeptidyl peptidases (DPP4) et de la glutaminyl cyclase (Martin Citron et al. 1994 ; M Citron et al. 1996 ; Valverde et al. 2021). Physiologiquement, la glutaminyl cyclase convertit le glutamate en position 3 en pyroglutamate. Cette conversion sur la région N-ter crée une résistance à la dégradation ce qui aboutit à un temps de demi-vie plus long pour la protéine. La surexpression de la glutaminyl cyclase et l'apparition des formes pyroglutamates d'A $\beta$  semblent corrélés chez les patients Alzheimer au niveau anatomique mais aussi au niveau des déclinis cognitifs. La caractérisation de la cyclisation de la glutaminyl cyclase sur A $\beta$  a été effectuée à l'aide de lignées cellulaires, de modèles murins et de l'inhibiteur PBD150 (De Kimpe et al. 2012 ; 2013). L'application orale d'un inhibiteur de la glutaminyl cyclase a permis de réduire la charge en A $\beta$  pE3-42 dans 2 modèles différents de souris transgéniques de la MA et dans un modèle de drosophile (Schilling et al. 2008). L'ensemble de ces travaux affirme que l'enzyme est impliquée dans la progression de la pathologie en fonctionnant à un pH plutôt acide, pH6 (pour le glutamate) et que l'homéostasie calcique jouerait également sur son activité. Une déplétion de calcium Ca $^{2+}$  dans le RE augmente spécifiquement l'expression génique et protéique de la glutaminyl cyclase (Hoffmann et al. 2017). Récemment, une prodrogue en phase 2, PQ912, ciblant cette enzyme, a été développée et semble produire un effet bénéfique en préclinique.

A $\beta$  pE3-x présente une propension à l'agrégation plus importante (D'Arrigo, Tabaton, et Perico 2009) que celle des autres espèces d'A $\beta$  ainsi qu'une forte hydrophobicité (perte des 2 aa chargés négativement). A $\beta$  pE3-x se replie très rapidement en feuillets  $\beta$  provoquant son oligomérisation et affectant l'agrégation d'A $\beta$  1-42. Ces propriétés biochimiques lui confèrent la formation de fibrilles et de canaux ioniques de plus large diamètre que celle d'A $\beta$  42 procurant donc une augmentation de la perméabilité ionique (Gillman et al. 2014 ; Joon Lee et al. 2014 ; Gunn et al. 2016). L'ensemble de ces paramètres confirme l'impact de ce fragment dans la pathologie

(Schlenzig et al. 2009 ; Wirths et al. 2009 ; Nussbaum et al. 2012). En effet A $\beta$  pE3-x constitue le peptide majoritaire dans les plaques compactes et diffuses ainsi qu'en intra-neuronal (Harigaya et al. 2000 ; Portelius et al. 2010). Par des injections d'A $\beta$  pE3-x chez la souris (Youssef et al. 2008) ou par des modèles murins transgéniques spécifiques, il a été démontré qu'A $\beta$  pE3-x induit une perte neuronale ainsi qu'un déclin cognitif et moteur (Alexandru et al. 2011 ; Meißner, Bouter, et Bayer 2015). D'autres modèles murins tels que les souris APP/PS1KI (pour Knock-In), 3xTg-AD, 5xFAD (Wirths, Bethge, et al. 2010 ; Jawhar, Wirths, et Bayer 2011) ou même la drosophile confirment la neurotoxicité et la présence d'A $\beta$  pE3-x en intra-neuronal mais spécifiquement dans les lysosomes (De Kimpe et al. 2013) et dans les cellules gliales. Pour prévenir les effets délétères d'A $\beta$  pE3-x, plusieurs équipes ont examiné les effets d'une immunothérapie ou l'application d'inhibiteurs tels que LY3002813, 9D5, 3D6, mE8 ou le D3 (Wirths, Erck, et al. 2010 ; DeMattos et al. 2012 ; Acero et al. 2020). Dans toutes les conditions malgré les différents modèles, on distingue une amélioration des performances cognitives, une diminution du niveau de l'expression d'A $\beta$  pE3-x, une diminution des plaques séniles et une augmentation de la microglie (Crehan et al. 2020). Des articles décrivent une corrélation entre la présence d'A $\beta$  pE3-x et de phospho-tau. Des souris invalidées (KO) tau, des cultures primaires de neurones et des patients Alzheimer révèlent que l'agrégation d'A $\beta$  pE3-x et sa toxicité sont dépendantes de tau et qu'il existe une corrélation entre tau hyperphosphorylée et ce fragment chez les patients Alzheimer (Nussbaum et al. 2012 ; Mandler et al. 2014).

## B- La localisation intracellulaire du peptide A $\beta$ :

Jusqu'au milieu des années 1990, les études faites sur la production du peptide A $\beta$  suggéraient une localisation essentiellement extracellulaire. En effet, aucune immunoréactivité de type A $\beta$  n'avait été mise en évidence à l'intérieur de la cellule, et le peptide A $\beta$  ne se visualisait qu'au niveau des plaques séniles extracellulaires. La production du peptide A $\beta$  intracellulaire a été mise en évidence pour la première fois par Wertkin et collaborateurs en 1993 à partir d'homogénat de cellules neuronales en culture (Wertkin et al. 1993). Celle-ci a ensuite été confirmée par de nombreuses équipes (Martin et al. 1995 ; Tienari et al. 1997 ; Greenfield et al. 1999) et sa contribution dans les dysfonctionnements pathologiques de la MA s'est révélée déterminante (Glabe 2001). En effet, la présence spécifique du peptide A $\beta$  42 intracellulaire a été mise en évidence dans des neurones hippocampiques d'individus présentant les symptômes cliniques prédéméntiels ou démentiels (Gouras et al. 2000). De plus, l'équipe du Pr. Octave associe la mort neuronale observée dans des cellules surexprimant la protéine  $\beta$ APP à une production du peptide A $\beta$  42 intracellulaire (Kienlen-Campard et al. 2002). De la même manière, Zhang et

collaborateurs montrent que l'incubation de cultures primaires neuronales avec une solution de peptide A $\beta$  40 ou A $\beta$  42 n'a aucun effet sur la viabilité des cellules, et seule une micro-injection dans ces mêmes cellules de peptide A $\beta$  42 (mais pas d'A $\beta$  40) sous forme fibrillaire ou non fibrillaire induit une forte mortalité neuronale dépendante des effecteurs pro-apoptotiques que sont les protéines Bax (pour BCL2 Associated X) et p53 (Yan Zhang et al. 2002). Il semblerait également que l'oligomérisation du peptide A $\beta$  se fasse à l'intérieur de la cellule (Walsh et al. 2000). Pour finir, une étude publiée dans *Neuron* met en évidence une forte corrélation entre la production de peptide A $\beta$  intracellulaire et l'apparition des premiers troubles cognitifs chez la souris transgénique 3xTgAD (Billings et al. 2005). Ainsi, l'une des hypothèses proposées par Gouras et collaborateurs (*Figure 17*) est une accumulation précoce et progressive du peptide A $\beta$  intracellulaire dans des MVB qui altérerait le transport axonal des organelles ce qui engendrerait un dysfonctionnement synaptique important avant même la sécrétion du peptide A $\beta$  extracellulaire (Gouras, Almeida, et Takahashi 2005). Cette hypothèse mettant au premier plan la neurotoxicité de la production du peptide A $\beta$  42 intracellulaire expliquerait aussi la mauvaise corrélation existante entre le déclin cognitif et l'apparition des plaques séniles.

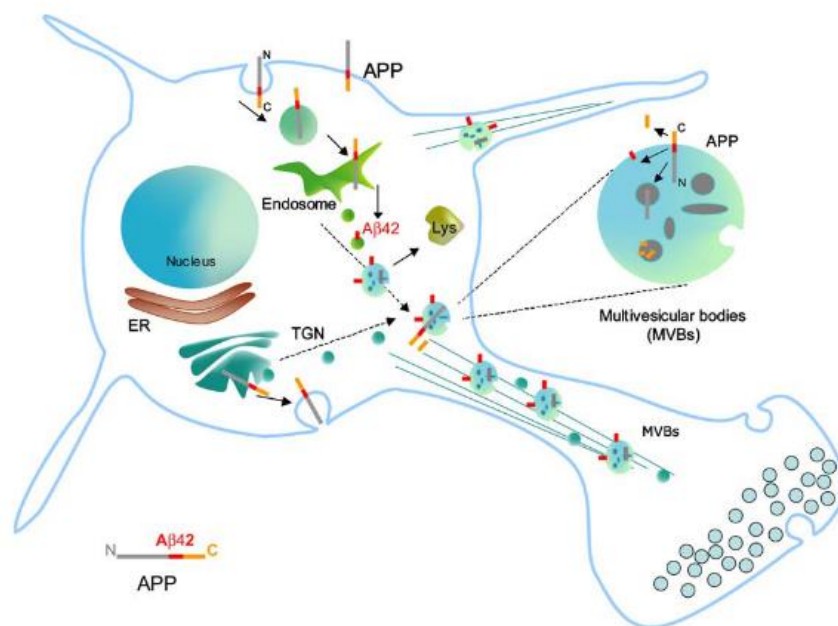


Figure 17 : L'accumulation intracellulaire du peptide amyloïde A $\beta$  (d'après Gouras et al, 2005)

## C-Les fonctions physiologiques du peptide amyloïde

### A $\beta$ :

Le peptide amyloïde A $\beta$  est un métabolite physiologique du clivage de la protéine  $\beta$ APP dans les neurones (C. Haass et al. 1992) et pourrait avoir de nombreuses fonctions physiologiques. Il modulerait la viabilité neuronale (Plant et al. 2003 ; Giuffrida et al. 2009), protégerait contre les toxicités du glutamate et de l'acide N-méthyl-D-aspartique (Baba et al. 2003), contrôlerait l'excitabilité neuronale (Kamenetz et al. 2003) et réduirait les dommages oxydatifs (Nunomura et al. 2001) (K. Zou et al. 2002 ; Atwood et al. 2003). Des travaux montrent qu'il présente aussi des propriétés de facteur de transcription (Bailey et al. 2011 ; B. Maloney et Lahiri 2011). De plus, de très faibles doses de peptide A $\beta$ , de l'ordre du picomolaire, pourraient moduler positivement la plasticité et la mémoire en augmentant la LTP (Puzzo et al. 2008 ; Morley et al. 2010), exercerait une activité neurotrophique (Yankner, Duffy, et Kirschner 1990) et contrôlerait la mort cellulaire (Sevalle et al. 2009). Une fois sécrété, le peptide A $\beta$  pourrait se lier à des récepteurs cellulaires. Plusieurs récepteurs ont été identifiés, dont la protéine PrPc (pour Protéine Prion cellulaire) à laquelle A $\beta$  se fixe sur l'ectodomaine (Laurén et al. 2009 ; Kessels et al. 2010). A $\beta$  se fixe également sur les récepteurs glutamatergiques NMDA et AMPA, ce qui régule ses effets sur la plasticité synaptique (Snyder et al. 2005 ; Rui et al. 2010). Enfin, l'A $\beta$  total, qui n'est pas tronqué en N-ter et dont le premier résidu est l'acide aspartique, pourrait avoir une fonction neuroprotectrice. En effet, l'inhibition de l'enzyme APA, qui dégrade l'extrémité N-ter du peptide A $\beta$ , diminue l'activation de la caspase-3, associée au traitement à la staurosporine, dans des cellules HEK-293 transfectées vecteur vide ou des fibroblastes sauvages qui présentent tous les 2 des niveaux endogènes d'A $\beta$  (Sevalle et al. 2009). Diverses autres propriétés ont été décrites à concentrations physiologiques : antioxydante, antimicrobienne (Gosztyla, Brothers, et Robinson 2018), vasoconstrictrice et modulatrice de l'agrégation plaquettaire (T. Thomas et al. 1996 ; Q. X. Li et al. 1998 ; Kontush 2001 ; Soscia et al. 2010).

## D-Le transport et l'élimination du peptide A $\beta$ :

Le peptide A $\beta$ , une fois synthétisé, sera dégradé par de nombreuses protéases (la néprilysine, l'enzyme de dégradation de l'insuline, l'enzyme de conversion de l'endothéline, ...) (T. Saido et Leissring 2012). Ces dernières agissent potentiellement à distance des sites de production du peptide, dans différents compartiments intra- et extracellulaires. Cette voie d'élimination dans la physiopathologie de la MA est primordiale car la dégradation d'A $\beta$  est catalytique et irréversible. Son fonctionnement exact fait d'elle une potentielle voie thérapeutique.

En plus de la dégradation catalytique, le peptide A $\beta$  peut être éliminé via d'autres mécanismes associant transport actif ou passif et clairance médiée par des cellules (Bates et al. 2009 ; Abhay P. Sagare et al. 2011 ; A. P. Sagare, Bell, et Zlokovic 2012), et particulièrement la microglie (Ries et Sastre 2016). Ainsi, RAGE (pour Receptor for Advanced Glycation End products) et LRP1 s'associent dans un mécanisme d'échange important au niveau de la BHE (pour Barrière Hémato-Encéphalique). En effet, ce duo régulerait l'influx et l'efflux du peptide A $\beta$  dans le cerveau. Hors du cerveau, les apolipoprotéines E et J, via une interaction avec LRP1 et LRP2, seraient aussi impliquées dans le transport du peptide A $\beta$  se liant directement avec lui. Arrivé dans le plasma, A $\beta$  se lierait à diverses molécules comme l'albumine, la HDL (pour High Density Lipoprotein), l'apolipoprotéine E, ... Ce transport plasmatique serait surtout possible grâce aux formes solubles de LRP1. Le peptide A $\beta$  serait alors éliminé au niveau du foie et des reins.

## E- Le rôle du peptide A $\beta$ dans la physiopathologie de la MA :

Selon l'hypothèse de la cascade amyloïde, l'agrégation d'A $\beta$  sous forme d'oligomères toxiques déclenche le processus physiopathologique de la MA. La formation des plaques séniles est un marqueur de ce processus d'agrégation pathologique et dépend de nombreux facteurs. Parmi eux, le fait que les différentes espèces d'A $\beta$  n'aient pas les mêmes propriétés d'agrégation, formant un ensemble hétérogène sensible à diverses variations qualitatives ou quantitatives. Ainsi, l'identification précise des formes neurotoxiques est compliquée et leur rôle dans la perte neuronale est encore à démontrer (Benilova, Karran, et De Strooper 2012). Plusieurs étapes complexes d'agrégation entraînent la formation des plaques séniles, à partir des formes monomériques d'A $\beta$ . Les mécanismes de toxicité des oligomères sont potentiellement liés à des mécanismes particuliers, comme des liaisons à des récepteurs, et à une toxicité plus générale en raison de leur capacité à se lier aux protéines et lipides membranaires. Si l'évènement initiateur de la cascade amyloïde est potentiellement l'agrégation pathologique du peptide A $\beta$ , d'autres mécanismes sont aussi impliqués (Y. Huang et Mucke 2012) comme : l'action de l'ApoE (D. M. Holtzman, Herz, et Bu 2012 ; C.-C. Liu et al. 2013 ; Reiss et Voloshyna 2013 ; Wolf et al. 2013), les lésions vasculaires (de la Torre, Jack C. 2012 ; A. P. Sagare, Bell, et Zlokovic 2012 ; Østergaard et al. 2013) ou l'inflammation ((Veerhuis, Nielsen, et Tenner 2011 ; Krstic et al. 2012 ; T. Wyss-Coray et Rogers 2012).

### a- La pathogénicité d'A $\beta$ :

## 1- L'oligomérisation et la fibrillogénèse :

Le peptide A $\beta$  présente la capacité de s'oligomériser. Il peut se trouver sous forme de monomères, mais également d'oligomères qui peuvent s'assembler pour former des protofibrilles et des fibrilles toxiques pour les cellules. Les fibrilles d'A $\beta$  agrégées sont les composantes majeures des plaques séniles. L'existence de ces agrégats protéiques dans la MA la rapproche de l'encéphalopathie à prion, caractérisée par l'agrégation irréversible de protéines résistante au mécanisme de clairance cellulaire, et par une propagation cellule à cellule des monomères (Brundin, Melki, et Kopito 2010). Ainsi la propagation des oligomères d'A $\beta$  dans de nouvelles zones du cerveau induirait progressivement la MA (Domert et al. 2014).

## 2- Les mécanismes :

Des études *in vitro* ont montré que les fibrilles d'A $\beta$  induisent une dystrophie neuritique et une perte neuronale sur des cultures de neurones de rat, de manière cohérente avec les lésions observées chez les patients (Christian J Pike et al. 1991 ; C. J. Pike, Cummings, et Cotman 1992). De plus, il a été montré que les formes oligomériques avaient un effet toxique sur la fonction synaptique (Christian Haass et Selkoe 2007). Cette neurotoxicité des formes insolubles et solubles d'A $\beta$  proviendrait principalement de l'accumulation du peptide qui activerait 2 mécanismes délétères pour les neurones : l'inflammation et le stress oxydant.

- A $\beta$  et l'inflammation

Les réponses immunes contre les pathogènes se déroulent d'une façon particulière dans le SNC, c'est-à-dire le cerveau, le cervelet et la moelle épinière. Enfermé dans une coquille rigide (c'est-à-dire le crâne et la colonne vertébrale), il supporte mal les oedèmes accompagnant les réactions inflammatoires. C'est pourquoi la protection immunitaire du SNC est assurée principalement par une population de cellules résidentes appelée microglie (J. A. Smith et al. 2012). La présence de microglie activées et d'astrocytes proches des plaques séniles indique le déclenchement d'une réponse inflammatoire associée à l'agrégation d'A $\beta$  (Giulian 1999). Au moment de l'inflammation, les microglies deviennent très ramifiées, prolifèrent, migrent vers la lésion, et deviennent une source importante de cytokines pro-inflammatoires ou de facteurs cytotoxiques. Initialement, le rôle des cytokines est de protéger, mais elles peuvent aussi être à l'origine de processus de neurodégénérescence car un niveau élevé de ces dernières implique un effet toxique néfaste pour la survie des neurones. Plusieurs cytokines pro-inflammatoires ont été trouvées dérégulées chez les patients atteints de la MA (Akiyama, Haruhiko et al. 2000). C'est notamment le cas pour IL1 (InterLeukine), IL6 et TNF $\alpha$  qui ont été trouvées régulées positivement (Bauer et al. 1991) et impliquées dans l'accumulation des plaques séniles. Selon certains, IL1



favorise la synthèse (Goldgaber et al. 1989 ; Mackenzie, Ian R. A. 2000) et le processus (Joseph D Buxbaum, Gandy, et Greengard 1992) de  $\beta$ APP. Elles peuvent donc promouvoir la production de peptide amyloïde  $A\beta$  et le dépôt des plaques. IL6 peut moduler la synthèse de  $\beta$ APP (Vandenabeele et Fiers 1991) et l'augmentation dans sa transcription et de son expression (Ringheim et al. 1998).  $TNF\alpha$  induit la mort des neurones (Mogi et al. 1994 ; D'Souza, Alinauskas, et Antel 1996). Les astrocytes peuvent également induire de tels processus via l'activation de voies pro-apoptotiques (Malchiodi-Albedi et al. 2001).

- $A\beta$  et le stress oxydant

Le stress oxydant se met en place lors de l'accumulation massive de radicaux libres dans une cellule. Ces radicaux libres sont des espèces activées de l'oxygène, c'est-à-dire le radical hydroxyle  $OH\cdot$  ou le monoxyde d'azote  $NO\cdot$ . A dose minime, ces molécules régulent de nombreux mécanismes de l'organisme. Cependant, elles sont également capables d'endommager de nombreuses autres molécules organiques. A dose excessive, les radicaux libres peuvent également induire des réactions inflammatoires pathologiques. L'influence du stress oxydant dans la MA a nettement été établi (M. A. Smith et al. 2000). Ainsi, l' $A\beta$  oligomérique soluble pourrait s'insérer dans la membrane plasmique des neurones et de la microglie entraînant la production de radicaux libres. Cela générerait une désorganisation de la membrane plasmique, menant à des processus critiques comme la perte de l'homéostasie du calcium, la perte de certaines fonctions protéiques ou l'activation de processus pro-apoptotiques.

### 3- Les autres mécanismes neurotoxiques d' $A\beta$ :

Plusieurs études montrent un effet délétère des oligomères solubles d' $A\beta$  sur le fonctionnement synaptique. Une stimulation répétée d'une synapse comme la collatérale de Schaffer, c'est-à-dire la synapse reliant les régions CA3 (Corne d'Ammon) et CA1 de l'hippocampe, peut générer une activation prolongée de la synapse (LTP). Le processus de mémorisation en est dépendant. Ainsi il a été montré chez le rongeur que les oligomères solubles d' $A\beta$  pouvaient perturber la formation de la LTP et par conséquent la mémoire (Walsh et al. 2002 ; Kamenetz et al. 2003). En 2005, l'équipe de Paul Greengard a proposé un mécanisme moléculaire. Via l'utilisation d'approches in vitro sur des cultures primaires de neurones de souris, cette étude démontre que l'application du peptide entraîne une baisse de la quantité de récepteurs glutamatergiques NMDA à la synapse (récepteurs essentiels à la LTP). Cette baisse serait due à l'interaction d' $A\beta$  avec des protéines régulatrices de l'endocytose de ces récepteurs. Ainsi en interagissant avec le récepteur nicotinique  $\alpha-7$ ,  $A\beta$  induirait une cascade de signalisation induisant la déphosphorylation des récepteurs NMDA et par conséquent leur endocytose via des

mécanismes clathrine-dépendants. L'accumulation du peptide A $\beta$  dans les neurones pourrait aussi être à l'origine de l'inhibition du système ubiquitine-protéasome (Almeida, Takahashi, et Gouras 2006) et de dysfonctionnements de la fonction mitochondriale (Caspersen et al. 2005), tous 2 des processus neurotoxiques.

## 6-LES DIFFERENTS FACTEURS DE LA MA

### A- L'âge :

La MA répond dans une majorité des cas à un déterminisme multifactoriel dont le principal facteur de risque est l'âge (Hirtz, D et al. 2007) avec une prédominance qui double tous les 5 ans après 65 ans. Des études ont étudié le risque de développer la maladie en fonction de l'âge et du sexe (S. Seshadri et al. 1997 ; Sudha Seshadri et Wolf 2007). 2794 participants de plus de 65 ans ont été suivis pendant plus de 29 ans et le risque de développer la MA a été évalué à 65, 75 et 85 ans selon le sexe. On constate qu'1 femme sur 5 et 1 homme sur 10 de plus de 65 ans peuvent développer la maladie durant le temps qu'il leur reste à vivre. Ainsi, selon l'âge de début, la MA est divisée en 2 catégories : les formes précoces ou EOAD (pour Early-Onset Alzheimer's Disease) qui rapportent 13% des cas et les formes tardives ou LOAD (pour Late-Onset Alzheimer's Disease) majoritaires à 87% (Gentier et Van Leeuwen 2015).

### B- Le terrain génétique :

Plusieurs sous-catégories de formes de MA sont classifiées en fonction du contexte historique familial et de la transmission génétique (Jean-Charles Lambert et Amouyel 2011). On distingue à ce jour les formes monogéniques dominantes avec les mutations sur les gènes *APP*, *PS1* et *PS2*, les formes familiales à transmission mendélienne non-classique et les formes sporadiques. Cependant les formes monogéniques et familiales sont souvent associées. Les formes monogéniques rares à transmission autosomale dominante et pour lesquelles des mutations génétiques causales ont été identifiées, affectent environ 1000 personnes en France et représentent environ 1% de l'ensemble des formes de MA dans le monde. Comme pour les autres maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson, les formes familiales sont les plus précoces, avec un âge de début généralement avant 65 ans. Les formes sporadiques, plus tardives, sont donc beaucoup plus fréquentes. Ces 2 formes sont susceptibles de se développer chez des personnes dont la famille

possède un historique Alzheimer. Ainsi, lorsqu'il s'agit des formes précoces, 60% des patients ont de multiples cas dans leur famille (Campion et al. 1999 ; Brickell et al. 2006).

La MA est une affection multifactorielle, résultant fréquemment de l'interaction entre des facteurs génétiques et des facteurs environnementaux. Dès 1934, il était connu que certaines formes présentaient une cause génétique, avec un mode de transmission autosomique dominant (Lowenberg et Waggoner 1934). Cependant, il aura fallu attendre les années 1980 pour la caractérisation des gènes impliqués. Tandis que, dans les formes les plus communes de la maladie, formes sporadiques à début tardif, il existe d'autres déterminants génétiques plus complexes et, à ce jour, si 75 loci ont été identifiés comme étant associés à la MA (Bellenguez et al. 2022), seul l'allèle *e4* du gène *APOE* a été explicitement établi comme gène de susceptibilité (Avramopoulos 2009).

Le point commun entre formes familiales et sporadiques est l'association d'un même type de démence à la présence des 2 lésions histologiques : les plaques séniles et les DNF. Contrairement aux formes familiales pour lesquelles des mutations causales ont été mises en évidence, les causes et l'éthiologie précise des formes sporadiques restent flous. Des analyses du LCS, de données d'imagerie des plaques séniles, et de données de volumétrie de cerveaux chez des patients atteints de formes familiales et sporadiques suggèrent des processus pathologiques communs (Bateman et al. 2012 ; Reiman et al. 2012). Des travaux sur les connectivités fonctionnelles dans le cerveau de patients atteints de MA ont montré une atteinte similaire dans les formes familiales et sporadiques (J. B. Thomas et al. 2014). Cependant, certaines études mettent en évidence des différences entre ces 2 types de pathologies. Une étude de 2009 montre que les patients atteints des formes familiales auraient un dépôt de plaques séniles plus important au niveau des ganglions de la base que les patients atteints des formes sporadiques (Villemagne et al. 2009). En 2012, une autre étude a montré des niveaux importants d'A $\beta$  42 dans le LCS très précocement dans les formes familiales et non dans les sporadiques (Reiman et al. 2012).

Les antécédents familiaux de la MA sont les plus importants facteurs de risque, après l'âge. Ce risque est 2 fois plus élevé chez les patients apparentés au premier degré à des membres de la famille atteints comparé à la population générale (Lautenschlager et al. 1996). Chez près de 12000 paires de jumeaux, l'héritabilité de la MA est estimée entre 60% et 80% (Gatz et al. 2006) suggérant une composante génétique importante. Même si ces variations représentent moins de 1% du génome humain, elles sont à l'origine de beaucoup de différences phénotypiques entre individus. La plupart des polymorphismes influencent les caractéristiques normales des sujets. Certains peuvent également donner un avantage en terme de survie et d'adaptation ou moduler le risque de certaines maladies. L'analyse des variations de l'ADN (pour Acide Désoxyribonucléique) est donc importante en biologie.

#### a- Les formes monogéniques de la MA :

A ce jour, 3 gènes ont été identifiés avec certitude comme étant impliqués dans l'étiologie de la MA. Des mutations à pénétrance élevée, rares, situées sur 3 gènes, *APP*, *PSEN1* et *PSEN2* qui codent respectivement pour les protéines  $\beta$ APP et les PS1 et PS2, sont responsables de formes monogéniques. Initialement elles étaient décrites dans les formes familiales à début précoce (Bekris et al. 2010).

Actuellement, elles représentent globalement moins de 1% des cas de MA, quelque soit leur âge d'apparition (Winblad, Bengt et al. 2016). Chez les patients qui développent la maladie avant 65 ans (précoce), les formes monogéniques correspondent à 6% des cas. Après 65 ans (forme tardive), elles représentent 3% des cas (Gentier et Van Leeuwen 2015). Dans l'ensemble, elles sont quand même caractérisées par un âge de survenue précoce et une transmission mendélienne autosomique dominante (Jean-Charles Lambert et Amouyel 2011). Ainsi, elles résultent toutes de la mutation d'un seul gène qui suffira au déclenchement de la maladie. La majorité des mutations retrouvées dans ces formes à transmission autosomique dominante sont ponctuelles c'est-à-dire la substitution d'un acide aminé par un autre (mutations faux sens).

Les formes monogéniques ont très vite été étudiées pour mieux comprendre le processus physiopathologique de la MA. En effet ces formes précoces caractérisées par de nombreux antécédents familiaux sont plus faciles à étudier que les formes sporadiques qui restent influencées par de nombreux facteurs environnementaux. Ainsi les modèles animaux et les hypothèses sur la physiopathologie de la maladie sont presque tous basés sur l'étude de ces formes minoritaires. Elles sont toutes caractérisées par la présence d'une mutation sur l'un des 3 gènes impliqués dans la voie amyloïdogène, responsable de la formation du peptide  $A\beta$  et des plaques séniles. Il existe actuellement environ 520 mutations connues sur le gène de  $\beta$ APP et des PS1 et 2 (L. Wu et al. 2012).

Aucun autre gène n'a pour le moment été identifié comme associé aux formes monogéniques de la MA.

#### 1- Les mutations sur le gène *APP* :

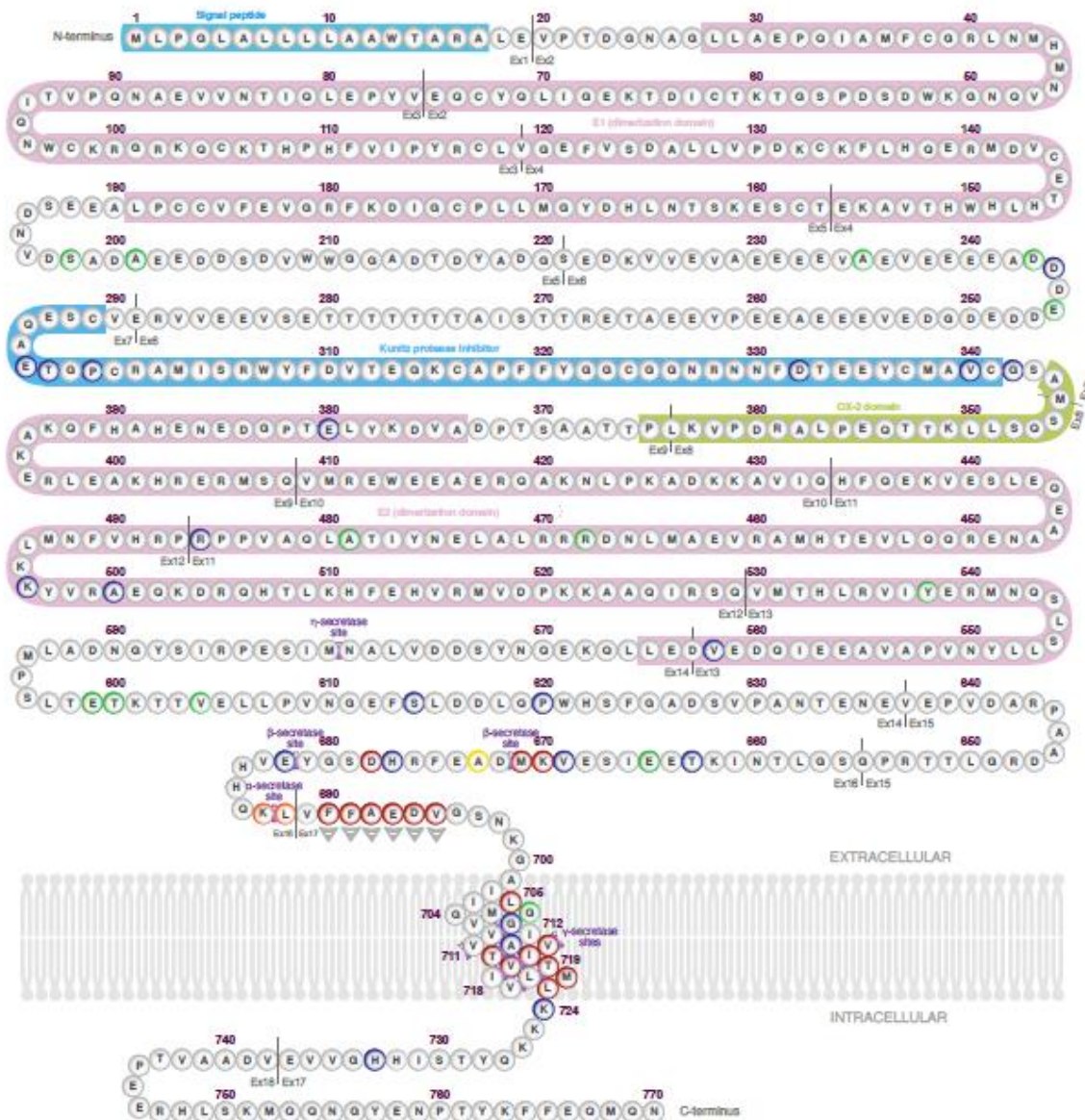


Figure 18 : Les mutations sur le gène APP (d'après [www.alzforum.org/mutations/app](http://www.alzforum.org/mutations/app))

Le gène de  $\beta$ APP, qui a été cloné en 1987 (Goldgaber et al. 1987 ; Kang et al. 1987 ; Robakis et al. 1987 ; Rudolph E. Tanzi et al. 1987), est situé sur le chromosome 21, composé de 18 exons (Yoshikai et al. 1990) et s'étend sur plus de 400 kb (Rooke et al. 1993). Par la suite, le séquençage du gène et l'étude des cas familiaux de MA ont permis d'identifier de nombreuses mutations (J. A. Hardy et Higgins 1992), 103 ont pour l'instant été découvertes, essentiellement des mutations ponctuelles et des duplications mais on dénombre environ 50 mutations pathogènes sur APP (Figure 18) dans la MA (Cacace, Slegers, et Van Broeckhoven 2016), toutes situées dans les exons 16 et 17 du gène. Ces exons sont ceux qui codent pour le peptide  $A\beta$  (Kitaguchi et al. 1988). En raison de leur positionnement à l'intérieur ou à côté des exons codant pour  $A\beta$ , toutes les mutations faux-sens d'APP influencent sa protéolyse et/ou son agrégation (Mayeux et Stern 2012). De plus, beaucoup de ces

mutations sont situées au niveau ou à proximité des sites de clivage par les enzymes impliquées dans les voies amyloïdogène ou non-amyloïdogène. En revanche, elles n'entraînent pas toutes une augmentation de la production du peptide A $\beta$ , elles peuvent aboutir à l'augmentation du ratio A $\beta$ 42/A $\beta$ 40 (Selkoe 1997 ; Guerreiro et al. 2010 ; Jonsson et al. 2012), qui sont les formes majoritairement produites.

Ainsi, la double mutation suédoise (K670N/M671L), découverte en 1992 (Mullan et al. 1992) et située à l'extrémité N-ter d'A $\beta$ , augmente sa production totale en fournissant un meilleur substrat pour l'activité  $\beta$ -sécrétase (M. Citron et al. 1992 ; X.-D. Cai, Golde, et Younkin 1993 ; Sinha et al. 1999 ; Vassar et al. 1999).

Les mutations autrichienne (T714I), iranienne (T714A), française (V715M), allemande (V715A), londonienne (V717I) et de Floride (I716V) augmentent l'agrégation du peptide A $\beta$  en favorisant la production d'espèces plus longues (A $\beta$  42) qui s'agrègent plus rapidement, se situant à proximité du site de clivage  $\gamma$  (N. Suzuki et al. 1994 ; K. Ancolio et al. 1999).

Les mutations arctique (E693G) (Nilsberth et al. 2001) et hollandaise (E693Q) (Levy et al. 1990) affectent la séquence primaire d'A $\beta$  dans sa région médiane augmentant son agrégation.

Il y a 10 ans une mutation en position 673 (A673T) de  $\beta$ APP réduisant le clivage  $\beta$ -sécrétase et la formation d'A $\beta$  a été identifiée sur une cohorte islandaise. Cette mutation protège des troubles cognitifs et de la MA (Jonsson et al. 2012). Cette mutation favoriserait le clivage  $\alpha$ -sécrétase à celui de la  $\beta$ -sécrétase, ce qui se traduit par une diminution des catabolites de la voie amyloïdogène (Giri, Lü, et Zhang 2016 ; Carmona, Hardy, et Guerreiro 2018).

À cette même position, une autre mutation (A673V) entraînerait l'augmentation de la production et de l'agrégation du peptide A $\beta$  à l'état récessif. En revanche, à l'état hétérozygote, le peptide produit et mutant interagirait avec le sauvage et réduirait sa capacité d'agrégation (Di Fede et al. 2009). Cette nouvelle forme d'A $\beta$  aux propriétés anti-amyloïdogènes ouvre la voie à de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur des peptides A $\beta$  modifiés (Di Fede et al. 2012).

Certaines formes autosomiques dominantes sont associées à une AAC (Cabrejo et al. 2006 ; Rovelet-Lecrux et al. 2006 ; Thonberg et al. 2011) suite à la microduplication d'une petite partie du chromosome 21 qui contient le gène *APP*. Ainsi, l'expression de  $\beta$ APP semble être augmentée dans le cerveau de patients Alzheimer par rapport aux témoins (J. Theuns 2000 ; Schröter et al. 2003), même si cela n'ait pas retrouvé dans toutes les études (Cyril Pottier et al. 2012).

Des variants génétiques seraient impliqués dans la MA en modulant l'activité transcriptionnelle de  $\beta$ APP. En effet, des mutations dans le promoteur du gène *APP* ont été retrouvées dans des études cas-témoins européennes de formes précoces. Ces dernières augmenteraient sa transcription (Brouwers et al. 2006 ; Jessie Theuns

et al. 2006). En revanche, dans une population française (Guyant-Maréchal et al. 2007), ces associations n'ont pas été retrouvées, seulement un polymorphisme (rs463946).

Même si des variants rares ont été observés dans les familles de patients Alzheimer à début tardif (Athán et al. 2001), les mutations sur le gène *APP* représentent une fraction très faible c'est-à-dire moins de 1% de tous les patients atteints de la maladie et environ 10 à 15% des cas de formes familiales (Bird 2008).

## 2- Les mutations sur le gène *PSEN1* :

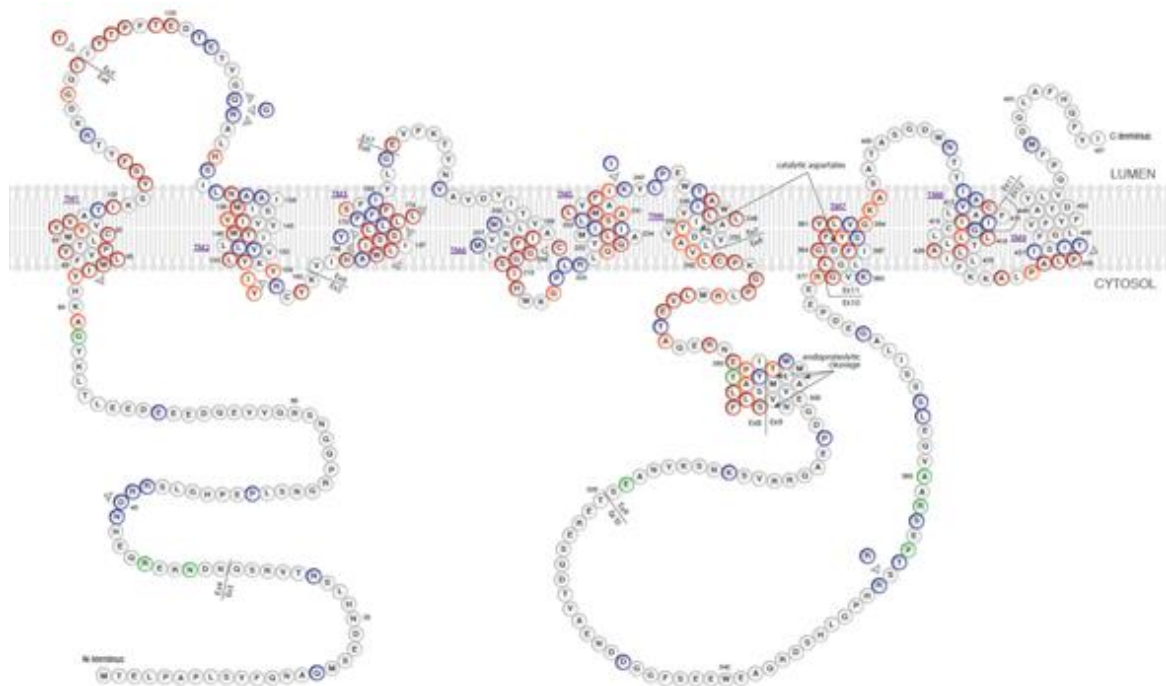


Figure 19 : Les mutations sur le gène *PSEN1* (d'après [www.alzforum.org/mutations/psen-1](http://www.alzforum.org/mutations/psen-1))

Au niveau du chromosome 14, locus 14q24 (Schellenberg et al. 1992), des études de liaison génétique et une approche de clonage positionnel ont identifié des mutations sur le gène *PSEN1* qui code pour la protéine PS1, correspondant au cœur catalytique de la  $\gamma$ -sécrétase (Sherrington et al. 1995). Ces mutations représentent la majorité (18 à 50 %) des formes familiales autosomiques dominantes de la MA (Campion et al. 1999 ; Bekris et al. 2010). En effet, on dénombre à ce jour 344 mutations différentes sur ce gène (Figure 19) dont certaines provoquent l'apparition de formes particulièrement précoces (Campion 1996).

Les mutations retrouvées sur *PSEN1* sont dites faux sens. Elles sont réparties sur toute la protéine mais particulièrement le domaine transmembranaire 2 et la boucle intracellulaire 6, où se trouve le site d'endoprotéolyse de PS1. Toutes ces mutations auraient la capacité de perturber le métabolisme de  $\beta$ APP, avec l'augmentation de



l'activité  $\gamma$ -sécrétase et donc l'augmentation de la production du peptide  $A\beta$  42 toxique (Castellani et al. 2008) par rapport au 40. C'est l'augmentation du ratio  $A\beta$ 42/ $A\beta$ 40 qui serait pathogène. Ce mécanisme suggère une perte de fonction partielle plutôt qu'un gain (Murayama et al. 1999 ; Walker et al. 2005 ; R. E. Tanzi 2012). Les mutations de *PSEN1* affecteraient la structure et la fonction de PS1 (Bentahir et al. 2006) mais aussi son interaction avec les autres membres de la  $\gamma$ -sécrétase (Cruts et Van Broeckhoven 1998). Un polymorphisme (-48 CC) situé dans le promoteur du gène *PSEN1*, tout comme pour *APP*, a été décrit comme associé à l'augmentation du risque de développer la MA et modulant l'expression de PS1 dans les formes précoces (Jean-Charles Lambert et al. 2001) mais pas tardives (Araria-Goumidi et al. 2002).

La majorité des mutations sur *PSEN1* sont ponctuelles et correspondent à la substitution d'un seul nucléotide, mais des petites insertions ou délétions ont également été décrites.

### 3- Les mutations sur le gène *PSEN2* :

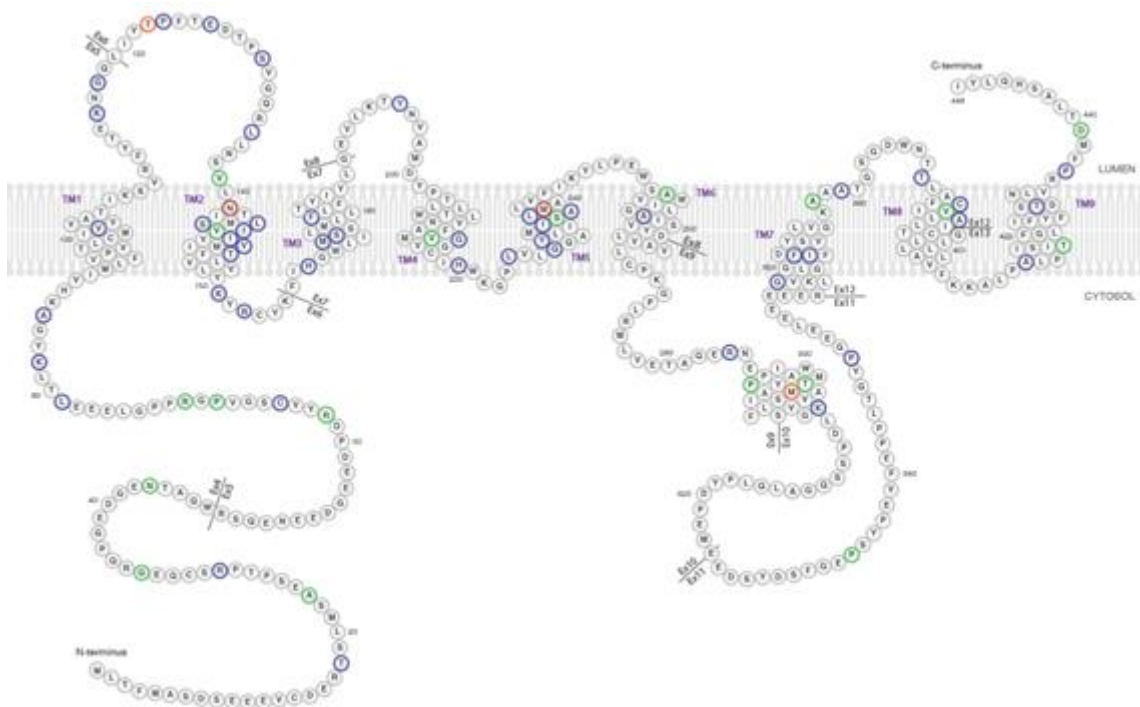


Figure 20 : Les mutations sur le gène *PSEN2* (d'après [www.alzforum.org/mutations/psen-2](http://www.alzforum.org/mutations/psen-2))

Dans le locus 1q42.13 situé sur le chromosome 1 (Rogaev et al. 1995 ; Sherrington 1996 ; Selkoe 1997 ; Walker et al. 2005), un gène présentant de fortes homologies avec *PSEN1* a été identifié en 1995 (Levy-Lahad, Wijsman, et al. 1995 ; Levy-Lahad, Wasco, et al. 1995). Ce gène *PSEN2* a été nommé ainsi en raison de la très forte homologie de séquence avec le gène *PSEN1*. Il code pour la protéine PS2, un autre membre de la  $\gamma$ -sécrétase, comme la PS1, mais le complexe ne peut contenir que



l'une des 2. Les mutations sur *PSEN2* sont plus rares. A ce jour, seules 77 mutations ont été découvertes (*Figure 20*) et sont responsables de formes autosomiques dominantes de la MA (5% des cas) (Bekris et al. 2010 ; Cruts, Theuns, et Van Broeckhoven 2012). Cependant certaines de ces mutations ne seraient pas fonctionnelles et les autres seraient moins agressives avec un âge de commencement plus tardif (45 à 88 ans) et très variable (Campion et al. 1999). Chez certaines mutations faux sens sur *PSEN2*, une pénétrance incomplète peut être retrouvée et leur effet serait modifié par d'autres gènes ou des facteurs environnementaux (Sherrington 1996). Tout comme pour *PSEN1*, certaines des mutations sur *PSEN2* entraîneraient une augmentation du peptide A $\beta$  42 toxique par rapport au 40 (Murayama et al. 1999 ; Walker et al. 2005 ; R. E. Tanzi 2012).

b- Les formes familiales sans transmission mendélienne classique :

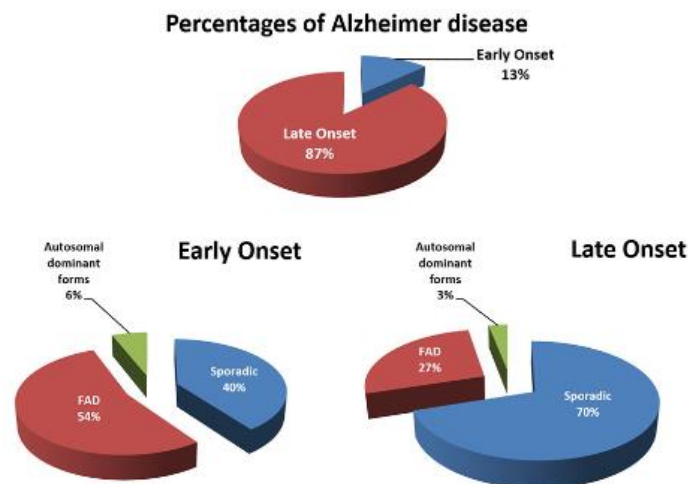


Figure 21 : Toutes les formes de la maladie d'Alzheimer (d'après Gentier et Van Leeuwen 2015)

On distingue les formes familiales des formes monogéniques car la MA est retrouvée chez des patients, dont un parent du premier degré est affecté, avec une agrégation familiale évidente mais sans pour autant retrouver une transmission mendélienne classique. Ces formes ne sont pas encore reliées à un chromosome en particulier (Gentier et Van Leeuwen 2015) et représentent 54% des formes précoces (*Figure 21*).

c- Les formes sporadiques :

Elles représentent la majorité des cas de MA. Ces formes, survenant après 65 ans, n'ont pas d'agrégation familiale ni de mode de transmission précis. On sait cependant que les femmes ont 2 fois plus de risque de développer la maladie après 80 ans (Letenneur et al. 1999). Pourtant, entre les hommes et les femmes, les taux

d'Aβ et tau ne seraient pas différents (Ferretti et al. 2018). Plusieurs études proposent que le taux d'oestrogène, décrit comme améliorant les fonctions cognitives mais diminué au moment de la ménopause, en serait responsable (R. Li, Cui, et Shen 2014 ; Ullah et al. 2019).

Le terme « formes sporadiques » est actuellement remis en question en raison de leur composante génétique potentiellement forte. C'est pourquoi certains parlent de formes à mode de transmission complexe ou non-mendélienne. Bien que difficile à établir (Traynor et Singleton 2010), leur apparition implique aussi une interaction avec des facteurs environnementaux. Identifier la part de génétique, appelée aussi facteurs de risque, est un enjeu des plus importants. En effet cela permettrait d'apporter de nouvelles connaissances sur la physiopathologie de la maladie, de développer de nouveaux marqueurs de diagnostiques et de dépistage, d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques et de nouveaux modes d'intervention.

S'il était possible de ralentir l'apparition de la MA, même d'un an, cela permettrait de grandement diminuer sa prévalence (Ziegler-Graham et al. 2008). La réserve cognitive est un concept qui englobe les bénéfices des activités intellectuelles, de l'éducation et du travail, une activité physique régulière et les méfaits de la consommation d'alcool, du tabagisme et de l'obésité chez les personnes d'une quarantaine d'années. Tous ces facteurs sont dits modifiables et sont les plus importants (Ballard et al. 2011 ; Weuve et al. 2012). Chez ces personnes, les accidents vasculaires cérébraux, le diabète, l'hypercholestérolémie et l'hypertension sont eux associés à un risque augmenté de développer la maladie. Une étude décrit que 50% des cas dans le monde seraient évités avec la suppression de 7 facteurs de risque : bas niveau d'éducation, dépression, diabète, hypertension, obésité, sédentarité et tabagisme (Barnes et Yaffe 2011). Malheureusement, l'étude des facteurs de risque associés à la MA est compliquée (Berr, Vercambre, et Akbaraly 2009).

Contrairement aux formes familiales, l'âge de commencement des formes sporadiques est plus tardif. De même que l'apparition de la maladie n'est pas due qu'à des mutations sur un seul gène, mais à un ensemble complexe dans lequel interviennent de nombreux gènes de susceptibilité et des facteurs environnementaux (Bird 2008). C'est ce qui caractérise une maladie multifactorielle. Ainsi, le risque de développer la MA associé aux facteurs environnementaux est compris entre 20 et 40% alors que d'un point de vue génétique, ce risque est de 60 à 80% (Gatz et al. 2006).

#### 1- Les facteurs de risque génétique :

- Le gène de susceptibilité de l'Apolipoprotéine E (*APOE*)

La protéine ApoE, une glycoprotéine de 299 aa, est impliquée dans le transport du cholestérol et le métabolisme des lipides. Son gène, situé sur le chromosome 19, locus 19q13.2, présente 3 principaux allèles différents, *e2*, *e3* et *e4*. L'allèle *e3* est le plus fréquemment retrouvé (65 à 70%) chez les caucasiens, suivi de l'allèle *e4* (15 à 20%) et de l'allèle *e2* (5 à 10%). Ainsi les différents isoformes sont nommés *APOE2*, *APOE3* et *APOE4*. *APOE3* est considéré comme neutre, *APOE2* comme protecteur (Corder et al. 1994 ; Royston et al. 1994 ; Silva et al. 2019) et *APOE4* comme un allèle à risque élevé. Il existe une forte corrélation entre posséder *APOE4* et le risque d'apparition de formes sporadiques tardives de MA (Farrer et al. 1997). En effet, sa présence accroît de façon dose-dépendante le risque de développer la maladie ainsi les hétérozygotes *e3/e4* et les homozygotes *e4/e4* sont concernés (Corder et al. 1993). Les porteurs d'une copie *APOE4* ont un risque multiplié par 4 et ceux en portant 2 ont un risque multiplié par 12 comparativement aux personnes qui ne la porte pas (Genin et al. 2011). Être porteur de cet allèle accélère l'âge d'apparition de 6 à 7 ans (Kuusisto et al. 1994 ; Kurz et al. 1996).

Le risque de développer la MA est de 51% chez les hommes et 60% chez les femmes qui portent *e4/e4*. Il est de 23% chez les hommes et 30% chez les femmes *e3/e4* (Genin et al. 2011).

Le gène *APOE* a été historiquement un des premiers candidats étudiés. L'association entre *APOE* et MA (Bignall 1993 ; Warren J Strittmatter et al. 1993) est rapportée pour la première fois en 1993 où dans la région du chromosome 19 (Pericak-Vance et Carrano 1991) un pic de liaison est détecté. De plus, dans les plaques séniles, une colocalisation d'ApoE est retrouvée (Namba et al. 1991 ; Wisniewski et Frangione 1992). Une liaison directe entre ApoE et A $\beta$  *in vitro* et *ex vivo* a déjà été montrée (Warren J Strittmatter et al. 1993 ; LaDu et al. 1994). Chez les patients Alzheimer, le niveau d'expression d'ApoE serait inversement corrélé à la quantité de plaques séniles observée (J-C Lambert 2005) et une diminution de cette quantité est observée dans un modèle de souris invalidées (KO) *APOE* (Bales et al. 1997).

L'ApoE régule le métabolisme des lipoprotéines (Mahley 1988) ayant plusieurs rôles dans le SNC, comme l'inflammation, la neuroplasticité et le transport du cholestérol (J. Kim, Basak, et Holtzman 2009). Au niveau du cerveau, qui produit le plus ApoE après le foie (Elshourbagy et al. 1985), elle est le principal transporteur de lipides formant les HDL à partir de cholestérol et de phospholipides (Y. Huang et al. 2004 ; Mahley, Weisgraber, et Huang 2006). En captant divers lipides (acides gras, cholestérol et phospholipides) et lipoprotéines (HDL, LDL et VLDL) ApoE régule et contrôle leur transport et leur redistribution dans le cerveau, en servant de ligand aux récepteurs de lipoprotéines situés à la surface de la cellule (comme le récepteur aux LDL) (Weisgraber et Mahley 1996 ; Y. Huang et al. 2004). ApoE aurait un rôle crucial dans de nombreux métabolismes dépendants notamment des radeaux lipidiques

grâce à sa capacité à moduler le métabolisme, le transport et la répartition du cholestérol, comme c'est le cas pour  $\beta$ APP (Wahrle et al. 2002 ; Cordy et al. 2003).

Au niveau neuropathologique, un taux élevé d'ApoE4 entraînerait une altération mitochondriale et donc une augmentation du stress oxydatif avec déstabilisation du métabolisme énergétique des neurones (Roses 2006 ; Zhong et Weisgraber 2009). Contrairement à l'ApoE4, l'expression d'ApoE2 et d'ApoE3 serait protectrice chez l'homme comme chez la souris (Corder et al. 1994 ; Farrer et al. 1997 ; Raber et al. 1998 ; Buttini et al. 1999 ; Tiraboschi et al. 2004). Cette protéine interviendrait dans différentes étapes du métabolisme de  $\beta$ APP et notamment la production, la clairance et l'accumulation du peptide  $A\beta$ .

Ainsi un taux élevé en cholestérol est associé avec *APOE4* au niveau de la production du peptide  $A\beta$  (Tao et al. 2014). De plus une forte concentration en cholestérol entrainerait une réorganisation des radeaux lipidiques des membranes favorisant une augmentation d'activité  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétase (Wahrle et al. 2002 ; Cordy et al. 2003) et une baisse de l'activité  $\alpha$ -sécrétase (Kojro, Gimpl, et Lammich 2001).

Concernant la clairance du peptide  $A\beta$ , l'ApoE4 aggraverait sa diminution alors même que ce phénomène a lieu au cours du vieillissement normal (R. E. Tanzi, Moir, et Wagner 2004). La baisse de clairance d' $A\beta$  par ApoE4 se ferait directement et indirectement, c'est-à-dire qu'ApoE4 et  $A\beta$  formeraient directement des complexes qui seraient moins rapidement éliminés que les complexes ApoE2- $A\beta$  ou ApoE3- $A\beta$  à travers la BHE (Castano et al. 1995 ; Bell et al. 2007 ; Deane et al. 2008) et indirectement l'ApoE réduirait la clairance d' $A\beta$  en réduisant l'expression de l'IDE (pour Insulin Degrading Enzyme), une enzyme dégradant  $A\beta$  (Farris et al. 2003 ; Jiang et al. 2008 ; Du et al. 2009). ApoE éliminerait les plaques séniles avec une différence d'efficacité en fonction de l'isoforme ( $e2 > e3 > e4$ ), l'isoforme *e4* étant celle dont l'efficacité d'élimination serait insuffisante ((Barger et Harmon 1997).

Enfin au niveau de l'accumulation du peptide  $A\beta$ , l'ApoE4 favoriserait son accumulation fibrillaire en s'y liant directement (Castano et al. 1995 ; Stratman et al. 2005 ; Reiman et al. 2009).

- GWAS



Les GWAS ont permis d'identifier 75 gènes et régions du génome (*Figure 22*) dont 42 nouveaux impliqués dans les voies amyloïde/tau ou liés à la microglie (Jean-Charles Lambert et al. 2010 ; Tosto et al. 2015 ; Jun et al. 2016 ; Naj, Schellenberg, et Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC) 2017 ; Sims et al. 2017 ; Jansen et al. 2019 ; Kunkle et al. 2019 ; Bellenguez et al. 2022) atteignant une significativité pangénomique. Ces facteurs de risque définis par les loci sont surtout des polymorphismes intergéniques ou introniques reliés avec le gène le plus proche. Certains de ces variants ainsi que leur rôle seront décrit plus bas dans une partie dédiée.

Des études fonctionnelles ont décrits l'implication physiopathologique de certains gènes associés aux loci des études de GWAS (Sottejeau et al. 2015 ; Van Cauwenberghe, Van Broeckhoven, et Sleegers 2016 ; Julien Chapis et al. 2017 ; P. Dourlen et al. 2017 ; Ubelmann et al. 2017). Même si ces variants fréquents représentent individuellement un risque faible de développer la MA, leur addition chez un individu représenterait un risque important surtout si les interactions génétiques de ces variants sont synergiques.

La majorité des facteurs de risque découverts n'augmentent que de 10 à 20% le risque de développer la MA. La présence de variants rares ayant de gros impacts peuvent en revanche multiplier ce risque par 3 (Jonsson et al. 2013). Cependant, on notera que les approches GWAS identifient des régions chromosomiques ou *loci*. Le gène le plus proche de ce locus identifié est alors défini comme gène de susceptibilité pour la maladie, mais la plupart de ces régions contiennent en fait plusieurs gènes et/ou polymorphismes. En effet, le locus de *BIN1* (pour Bridging integrator 1) contient uniquement le gène *BIN1* mais le locus de *CELF1* contient en fait de nombreux autres gènes. Dans ce cas, c'est plus de 130 gènes qui se retrouvent associés à la pathologie. De plus, la plupart de ces gènes est associée de façon indirecte et ne constitue donc pas de réels facteurs de susceptibilités génétiques. Il est donc important de déterminer quel polymorphisme est fonctionnel et identifier les gènes impliqués dans chaque locus pour permettre ensuite une meilleure compréhension de la contribution de ces derniers dans le processus physiopathologique de la MA (Pierre Dourlen, Chapis, et Lambert 2018). La susceptibilité que confère chaque variant de gènes identifiés varient de l'un à l'autre tout comme leur fréquence dans la population. *APOE* est le facteur de risque le plus important avec une fréquence proche de 5%. Les autres variants sont généralement associés à des risques faibles car de faible fréquence. En revanche certains auront une fréquence élevée dans la population et donc plus de risque de développer la MA (Robinson, Lee, et Hane 2017).

#### ✓ GWAS et l'hypothèse amyloïde

Les GWAS suspectent 3 voies de signalisation majeures impliquées dans la physiopathologie de la MA : le métabolisme des lipides, la régulation du système

immunitaire, et le système endosomal de recyclage des vésicules. Les analyses GWAS sont réalisées sans à priori sur la fonction biologique des gènes étudiés, ce qui rend particulièrement difficile l'élaboration d'hypothèses permettant d'expliquer leur rôle dans la physiopathologie. C'est pourquoi, seule la réalisation d'analyses « post-GWAS » peut confirmer les mécanismes moléculaires impliquant ces gènes. Parmi eux, en fonction de leurs rôles déjà connus dans des mécanismes susceptibles de contrôler le métabolisme de  $\beta$ APP ou l'accumulation du peptide A $\beta$ , des modulateurs peuvent être proposés.

❖ Quelques exemples de candidats issus de GWAS

▪ *CLU* (Clusterin)

CLU (ou ApoJ) est une apolipoprotéine impliquée dans le transport du cholestérol, des phospholipides et l'élimination d'A $\beta$  via son endocytose et/ou son transport au travers de la BHE (DeMattos et al. 2004). La diminution de CLU réduirait la formation des plaques séniles et la neurotoxicité associée (P.L. McGeer, Kawamata, et Walker 1992 ; DeMattos et al. 2002). CLU serait d'ailleurs augmentée dans le LCS de patients atteints de la MA (Nilselid et al. 2006). Un niveau élevé de CLU plasmatique est associé à une atrophie du cerveau ainsi qu'à la sévérité et la prévalence de la MA (Thambisetty et al. 2010 ; Schrijvers et al. 2011). CLU joue aussi un rôle dans le système du complément en inhibant la réponse immunitaire (Pucci et al. 2019). Une mauvaise redistribution de cholestérol peut affecter la plasticité synaptique, la mémoire et l'activité neuronale et être un facteur de risque pour la MA (Sparks et al. 1994 ; Solomon et al. 2009). En effet,  $\beta$ APP est retrouvée dans les radeaux lipidiques et l'A $\beta$  peut être lié par le cholestérol où une élévation de la concentration du cholestérol intracellulaire corrèle avec le processus amyloïdogène de  $\beta$ APP (Refolo et al. 2000).

▪ *CR1* (Complement Receptor type 1)

CR1 serait impliqué dans l'activation de la microglie en réponse au peptide A $\beta$ , tout comme *TREM2* (pour Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2) et *CD33* (Griciuc et al. 2013). CR1 fait partie de la voie du complément et est le récepteur du C3b et du C4b, favorisant l'internalisation des complexes immuns. CR1 favoriserait la clairance d'A $\beta$ , ce dernier étant capable de se complexer avec le C3b (Crehan et al. 2012). CR1 code pour un récepteur érythrocytaire qui peut être lié par A $\beta$  oligomérique pour l'exporter hors de la circulation sanguine (Tony Wyss-Coray et al. 2002 ; Rogers et al. 2006).

▪ *PICALM* (Phosphatidylinositol binding clathrin assembly protein)

Des analyses fonctionnelles ont mis en évidence son rôle dans l'endocytose lié au métabolisme de  $\beta$ APP. PICALM recrute les clathrines sur les sites d'ancrage des vésicules intracellulaires favorisant ainsi l'endocytose (Tebar, Bohlander, et Sorkin 1999), libère des neurotransmetteurs et agit dans la formation de la mémoire. Elle colocalise avec  $\beta$ APP et sa sous-expression altère son transport, alors que sa surexpression favoriserait la formation des plaques séniles dans la MA (Koo et Squazzo 1994 ; Carey et al. 2005 ; Harold et al. 2009 ; Xiao et al. 2012). Il a été décrit que PICALM et tau anormalement hyperphosphorylée colocalisent au niveau des DNF dans le cerveau des patients Alzheimer. Les 2 pourraient être clivées par les mêmes caspases (Ando et al. 2013).

- *BIN1* (Bridging integrator 1)

BIN1 contrôle l'endocytose médiée par les clathrines avec le bourgeonnement des vésicules d'endocytose et la dynamique du cytosquelette (Pant et al. 2009), contrôlant potentiellement une partie du métabolisme de  $\beta$ APP. La protéine BIN1 interagirait avec tau (J Chapis et al. 2013) et serait impliquée dans sa toxicité. Elle serait également impliquée dans l'homéostasie du calcium (M.-S. Tan, Yu, et Tan 2013). Sa dérégulation peut induire de la mort neuronale et un déclin cognitif. Cette signalisation est mise en jeu dans de nombreux processus intra- et extra-cellulaires allant de l'activité synaptique à la communication cellulaire, en passant par l'adhésion cellulaire. Dans le cerveau, l'ion calcique  $Ca^{2+}$  est fondamental pour le contrôle de l'activité synaptique et l'élaboration de la mémoire (Kennedy 2016). Le contrôle de cette homéostasie est donc primordial pour l'état physiologique du cerveau mais aussi pour le maintien de l'intégrité neuronale et la survie à long terme des cellules. La dérégulation de son homéostasie peut expliquer la vulnérabilité de certaines populations de neurones dans certaines maladies. Or, il se trouve qu' $A\beta$  serait étroitement lié à cette homéostasie, notamment via l'excitotoxicité où il stimulerait l'activité des récepteurs glutamatergiques de type NMDA (Alberdi et al. 2010).  $A\beta$  serait capable de former des pores calciques (Sepulveda et al. 2010 ; C. Peters et al. 2016) entraînant un influx d'ions calcium et la modification du potentiel membranaire. Le niveau de calcium intracellulaire agirait sur la production d' $A\beta$  ainsi que sur le métabolisme de  $\beta$ APP (J D Buxbaum et al. 1994 ; Kyratzi et Efthimiopoulos 2014), formant ainsi une boucle de régulation calcium/ $A\beta$  (Berridge 2014 ; Yong Wang, Shi, et Wei 2017). Après *APOE*, *BIN1* est proposé comme le facteur de risque le plus important de la MA.

L'équipe du Dr Lambert s'est intéressée au rôle potentiel du gène *BIN1* sur le métabolisme de  $\beta$ APP. BIN1 étant une amphiphysine impliquée dans la régulation de l'endocytose (Itoh et Decamilli 2006), ce facteur de risque génétique constituerait un très bon candidat pour contrôler la production du peptide  $A\beta$ . Malheureusement, après des analyses dans différents modèles d'études cellulaires, aucun impact de BIN1 sur le métabolisme de  $\beta$ APP n'a pu être observé (J Chapis et al. 2013).



- *CD2AP* (CD2 Associated Protein)

C'est une protéine adaptatrice impliquée dans le transport membranaire. Elle favoriserait le transport de  $\beta$ APP de l'endosome précoce vers la voie de dégradation lysosomale (Furusawa et al. 2019).

- *CD33*

C'est un récepteur de cellules myéloïdes et microgliales principalement, impliqué dans la recapture d'A $\beta$  extracellulaire. Il serait augmenté chez des patients atteints de la MA et son variant rs3865444 serait un facteur protecteur dans la pathologie (Griciuc et al. 2013). De plus, CD33 est aussi impliqué dans des processus d'endocytose.

- *TREM2* (Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells 2)

Cette protéine est retrouvée au niveau des membranes microgliales et serait impliquée dans la phagocytose ainsi que dans l'élimination des débris neuronaux. Sa mutation R47H pourrait d'ailleurs augmenter le risque de développer la MA par 3 (Jonsson et al. 2013 ; Gratuze, Leyns, et Holtzman 2018).

❖ Les facteurs de risque étudiés dans le cadre du LabEx DISTALZ

- *ADAM30*

ADAM30 a été retrouvée sous-exprimée dans le cerveau des patients Alzheimer. Ainsi, dans différents modèles, sa sous-expression augmente tous les produits du métabolisme de  $\beta$ APP comme chez les malades. En revanche, sa surexpression entraîne le résultat opposé (Letronne et al. 2016). ADAM30 modulerait directement l'activité des sécrétases ( $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ ). Les auteurs précisent que si ADAM30 régulerait uniquement l' $\alpha$ -sécrétase, seule une diminution de sAPP $\alpha$  aurait été observée. De plus, il semblerait qu'ADAM30 ne soit pas localisée à la membrane plasmique ce qui exclut toute interaction directe avec l' $\alpha$ -sécrétase.

- *FERMT2* (FERM Domain Containing Kindlin 2)

C'est une co-activatrice de la voie des intégrines impliquée notamment dans l'adhésion cellule-matrice extracellulaire qui influencerait le recyclage de  $\beta$ APP, via les endosomes Rab4A-positif (H. Li et al. 2017). Une sous-expression de FERMT2 augmenterait  $\beta$ APP à la membrane cellulaire et favoriserait la production du peptide

A $\beta$ . Elle serait également impliquée dans la toxicité de tau où sa diminution entraînerait une neurodégénérescence oculaire chez la drosophile (Shulman et al. 2014).

Le micro-ARN 4504, qui est surexprimé dans le cerveau des patients Alzheimer par rapport aux témoins, baisse l'expression du gène *FERMT2*. Cette sous-expression dépendrait de la présence du variant rs7143400 localisé dans la région 3'UTR de l'ARNm de *FERMT2* qui modulerait le métabolisme de  $\beta$ APP et augmenterait la sécrétion du peptide A $\beta$ . Les effets de *FERMT2* sur le métabolisme nécessiteraient une interaction directe (Eysert et al. 2021). Cette dernière participerait à la régulation de la croissance axonale et à la synaptogenèse. Induire la sous-expression de *FERMT2* montre une baisse de la plasticité synaptique qui est un mécanisme potentiellement à l'origine de l'effet délétère de cette sous-expression dans les neurones et dans le processus physiopathologique de la MA.

- *SORL1* (Sortilin Related receptor 1)

La sous-expression de SorLA est associée avec une augmentation de la production du peptide A $\beta$  en inhibant la redirection de  $\beta$ APP vers le TGN (Andersen et al. 2005). D'autres études fonctionnelles ont notamment suggéré que la sous-expression de SorLA diminue la dégradation d'A $\beta$  intracellulaire via le lysosome, participant ainsi à son accumulation (Schmidt et al. 2007 ; Willnow et Andersen 2013). Cette protéine aurait donc un effet protecteur en diminuant la production d'A $\beta$ , ainsi des mutations de *SORL1* seraient associées aux formes précoces ou tardives de la MA (Rogaeva et al. 2007). *SORL1* et sa protéine SorLA seront décrits plus en détail dans un chapitre dédié.

- *PTK2B* (Protein Tyrosine Kinase 2 Beta)

La tyrosine kinase Pyk2 a été identifiée dans de multiples études GWAS comme un facteur de risque de la MA tardive (Kamboh et al. 2012 ; Jean-Charles Lambert et al. 2013 ; Beecham et al. 2014 ; Jiao et al. 2015 ; Y.-Q. Li et al. 2016 ; Nettiksimmons et al. 2016 ; E. Lin et al. 2017), et au moins un variant de gène *PTK2B* est associé à la MA (rs28834970) entraînant une augmentation de l'expression de Pyk2 dans les monocytes humains (Chan et al. 2015). Biochimiquement, Pyk2 présente une activité accrue à la fois dans les tranches de cerveau de souris sauvages traitées avec des oligomères d'A $\beta$  et dans les lysats de cerveau de souris APP/PS1 âgées (Kaufman et al. 2015 ; Haas et Strittmatter 2016). Pyk2 semble être associée à la sclérose de l'hippocampe (Beecham et al. 2014), à la progression de la maladie (Yiling Wang et Xue 2014) et au déclin cognitif (Nettiksimmons et al. 2016). Tout comme *SORL1*, un chapitre est dédié à *PTK2B* et sa protéine Pyk2 sur laquelle j'ai réalisé des travaux préliminaires dans la continuité de ceux de SorLA.

Ainsi, il apparaît nécessaire d'apporter de nouveaux arguments pour permettre de sélectionner des gènes susceptibles de moduler le métabolisme de  $\beta$ APP. Parmi les nombreux gènes localisés dans des régions chromosomiques associées par GWAS à la MA, seul un petit nombre serait lié au processus physiopathologique de la maladie. Malheureusement, la validation fonctionnelle de l'implication de chacun de ces candidats s'avère compliquée, longue et rébarbative par des approches classiques de biologie cellulaire. C'est pourquoi le développement d'outils cellulaires et l'utilisation de méthodologies permettant une analyse à haut débit apparaissent essentiels pour répondre à cette problématique.

## C- Les facteurs environnementaux :

Un grand nombre d'autres facteurs potentiels de la MA existe mais leur véritable rôle est encore discuté.

### a- Les facteurs socio-économiques :

De nombreux facteurs socio-économiques peuvent impacter le risque de développer la MA, comme l'activité physique, la consommation de tabac ou d'alcool, le niveau d'éducation (J.-H. Chen, Lin, et Chen 2009) ainsi que le régime alimentaire (Joseph et al. 2009 ; Féart, Samieri, et Barberger-Gateau 2010).

### b- Les facteurs vasculaires et métaboliques :

Plusieurs études démontrent une association entre l'hypertension artérielle en milieu de vie et la MA (Korf et al. 2004 ; Duron et Hanon 2008 ; R. Peters et al. 2008), entre le diabète et la MA, avec une incidence multipliée par 1,5 à 2 fois chez les diabétiques (Luchsinger et al. 2007) et entre l'obésité en milieu de vie et les démences (Beydoun, Beydoun, et Wang 2008). Des études ont aussi montré une association de l'hypercholestérolémie avec la MA (Kaarin J. Anstey, Lipnicki, et Low 2008 ; Reitz, Brayne, et Mayeux 2011).

#### 1- Les maladies cérébrovasculaires :

La relation entre MA et maladies cérébrovasculaires n'est mise en évidence que depuis une dizaine d'années (Qiu 2011 ; Kling et al. 2013). Le facteur de risque commun à toutes ces maladies cérébrovasculaires est l'hypertension qui cause d'importantes lésions vasculaires, tant au niveau périphérique que central. Dans le cas des patients Alzheimer, les plaques d'athérome (dépôt de plaques constituées de lipides, de cellules inflammatoires, de cellules musculaires lisses et de tissu conjonctif qui se fixent sur les parois internes des artères) sont plus nombreuses que

les témoins ou les patients présentant une autre forme de maladie neurodégénérative (Yarchoan et al. 2012). Dans un modèle d'hypertension chez des souris APP/PS1, une baisse du réseau de capillaires cérébraux d'environ 25%, liée à une augmentation d'environ 40% de plaques séniles cérébro-vasculaires, a été décrite (Cifuentes et al. 2015). Enfin, l'hypertension chez le rat âgé diminuerait l'expression du gène *MAPT* codant pour la protéine tau, ainsi que les gènes codants pour les protéines de liaison à  $\beta$ APP (Csiszar et al. 2013).

## 2- L'hyperinsulinémie et le diabète de type II :

Le diabète augmenterait le risque de développer la MA (Profenno, Porsteinsson, et Faraone 2010 ; Cheng et al. 2012 ; Gudala et al. 2013). En effet, plusieurs études décrivent un lien important entre les dysfonctions dans la voie de l'insuline et la maladie (Craft et Stennis Watson 2004 ; de la Monte 2009). L'insuline est une hormone principalement impliquée dans le métabolisme énergétique. Même si elle est périphérique, l'insuline peut traverser la BHE grâce à un transporteur (Banks et al. 1997 ; Cholerton, Baker, et Craft 2013). Elle serait également produite directement au niveau des neurones (Ghasemi et al. 2013). Dans le cerveau, l'insuline se lie à son récepteur, l'IR (pour Insuline Receptor), et entraîne par exemple les processus d'apprentissage et de mémorisation, la régulation de l'homéostasie énergétique ou la survie neuronale (Plum, Schubert, et Brüning 2005 ; Freude, Schilbach, et Schubert 2009). L'insulino-résistance et une perturbation de la voie de l'insuline sont les facteurs communs majeurs entre la MA et le diabète de type II.

Plusieurs études de population ont mis en évidence une augmentation de 65% du risque de développer la MA chez les patients diabétiques (Arvanitakis et al. 2004 ; Janson et al. 2004). Cette pathologie est caractérisée par une hyperglycémie liée à une insulino-résistance en raison de dysfonctions au niveau des cellules  $\beta$  du pancréas, se généralisant à l'ensemble de la périphérie et au SNC (Correia et al. 2012). Ce diabète est considéré comme un facteur de risque important pour les démences (MA incluse) en raison des altérations de fonctions et de structures constatées au niveau du SNC chez les patients diabétiques de type II chronique.

## 3- La dyslipidémie et l'obésité :

L'hypercholestérolémie (haut niveau de cholestérol détecté dans le plasma) est aussi un facteur de risque de la MA (Kivipelto et al. 2001 ; Reitz, Brayne, et Mayeux 2011). Ce cholestérol interviendrait dans la maladie par 2 mécanismes différents. D'une part, l'hypercholestérolémie est un facteur de risque de l'athérosclérose directement impliquée dans les maladies cérébrovasculaires et un facteur de risque vasculaire important dans la MA. D'autre part, elle changerait la composition des radeaux lipidiques, éléments centraux du métabolisme de  $\beta$ APP contenant les  $\beta$ - et  $\gamma$ -sécrétases et favoriserait une augmentation de leur activité et donc une

augmentation de la production du peptide A $\beta$  (Fassbender et al. 2001 ; Korade et Kenworthy 2008 ; Rushworth et Hooper 2011).

L'obésité est également un facteur de risque important de la MA (Whitmer et al. 2008 ; Tolppanen et al. 2014) lié à l'hypercholestérolémie et évalué dans une méta-analyse (Profenno, Porsteinsson, et Faraone 2010). Une forte adiposité induit l'insulino-résistance, la production d'AGE (pour Advanced Glycosylation End products) délétères et une inflammation conduisant à une augmentation du stress oxydatif dû à la production de ROS (Luchsinger et Gustafson 2009).

#### c- Le stress oxydatif :

De nombreuses pathologies, dont la MA, sont issues ou présentent une altération du fonctionnement mitochondrial avec pour principal effet une augmentation du stress oxydatif en une perturbation importante du métabolisme énergétique (Pathak, Berthet, et Nakamura 2013). Ce stress conduit à la perturbation du fonctionnement voire à la mort cellulaire. Dans le cas de la MA, plusieurs voies entraînent l'augmentation du stress oxydatif. L'inflammation consécutive à la formation des plaques séniles, à la mort neuronale ou aux lésions de la BHE favorise son augmentation. La perturbation du métabolisme glucidique par l'insulino-résistance et par la dyslipidémie (liée à l'hyperinsulinémie ou un défaut dans le transport lipidique) entraînerait une dérégulation progressive de la fonction mitochondriale. Les mitochondries étant elles-même une source majeure de production de ROS, leur dérégulation conduit à la production augmentée de ROS et donc du stress oxydatif qui amplifie le dysfonctionnement des mitochondries (Rocha et al. 2010). L'accumulation du peptide A $\beta$  génère un stress oxydatif important pour les neurones et témoigne d'une altération mitochondriale. La surexpression de  $\beta$ APP et l'augmentation du stress oxydatif provoquent une accumulation d'A $\beta$  dans les lysosomes qui est associée à une augmentation de l'apoptose (L. Zheng et al. 2009).

#### d- Les expositions environnementales :

Le tabagisme apparaît également associé à un sur-risque de démence et de déclin cognitif (K. J. Anstey et al. 2007). De plus certaines études ont montré que l'exposition à des métaux, tels que l'aluminium (Ferreira et al. 2008), le zinc (C.-Y. Wang et al. 2010), le cuivre (Hou et Zagorski 2006) ou encore le plomb (J. Wu et al. 2008) pouvait avoir un impact sur le risque de développer la MA, notamment en agissant sur l'agrégation du peptide A $\beta$  (C.-Y. Wang et al. 2010).

### D- Les facteurs protecteurs :

À l'inverse des facteurs associés à une augmentation du risque de développer une démence ou un déclin cognitif, d'autres facteurs ont été démontrés comme protecteurs. C'est le cas du niveau d'éducation et/ou des activités de loisirs (Meng et D'Arcy 2012). Dans ce sens, la réserve cognitive aurait un effet protecteur dès l'école primaire (Dekhtyar et al. 2015). Tout comme la diététique, l'activité physique représente un facteur lié au mode de vie et pourrait être traitée également avec les facteurs vasculaires. Les activités intellectuelles et sociales sont également envisagées comme des facteurs de protection face à la MA. Chez les personnes présentant une MA, les activités intellectuelles sont réduites que ce soit en intensité ou en diversité (R. S. Wilson et al. 2002). Plusieurs études ont examiné de façon spécifique les effets potentiels de l'entraînement cognitif sur le risque de MA. Dans une étude de cohorte, des analyses ont été effectuées sur 5698 participants sans démence, âgés de 65 ans et plus. Stimuler les activités de loisirs est significativement associé à un risque réduit de MA (Akbaraly et al. 2009). Enfin très récemment, une étude décrit les effets bénéfiques d'une consommation régulière de caféine (Paiva et al. 2022).

## 7-SorLA

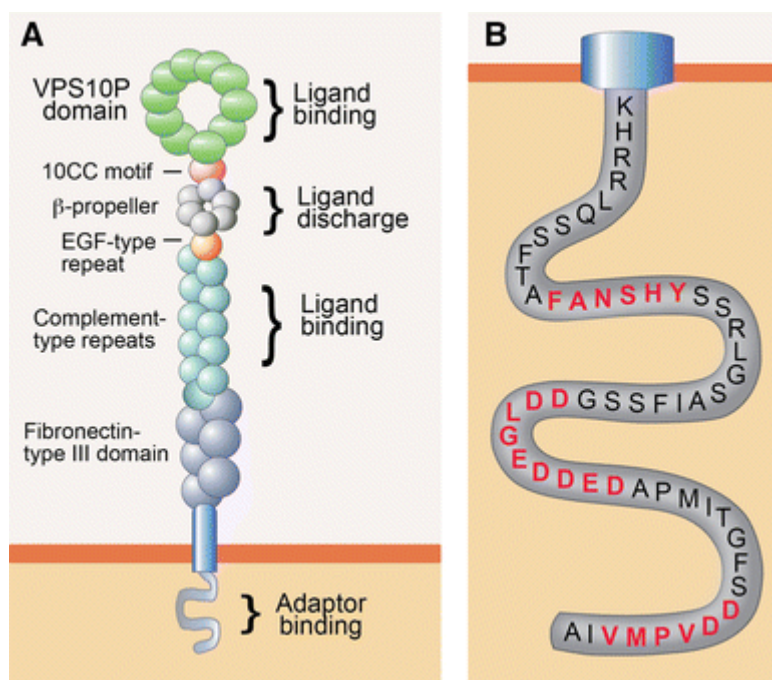


Figure 23 : L'organisation structurale de la protéine SorLA (d'après Schmidt et al, 2016)

*SORL1* est un gène situé sur le bras long du chromosome 11, locus 11q23.2. Il code pour une protéine mosaïque qui appartient à au moins 2 familles, Vps10 et LDLR. SorLA est une protéine transmembranaire de 250 kDa (Figure 23) exprimée dans les neurones du système nerveux périphérique et central. C'est un récepteur, membre

un peu moins apparenté au reste de la famille des LDLR, non seulement au niveau de sa structure, mais aussi de sa localisation et son trafic intracellulaire. Dans sa structure SorLA ne possède pas de domaine homologue au récepteur EGF dans sa région luminale, mais possède plutôt un domaine Vps10p et des répétitions d'un domaine fibronectine III (Cam et Bu 2006). Les autres membres de la famille du récepteur Vps10p sont la sortiline (C. M. Petersen et al. 1997), SorCS-1 (Hermeij et al. 1999), SorCS-2 (Rezgaoui et al. 2001) et SorCS-3 (Hampe et al. 2001). Leur motif structural commun, le domaine Vps10p, est un domaine de liaison pour de nombreuses protéines cibles, identifié pour la première fois chez la levure (Marcusson et al. 1994). Les séquences de ces domaines Vps10p et leurs profils d'expression varient considérablement entre les membres de cette famille (Westergaard et al. 2004) suggérant différentes fonctions de ces récepteurs (Willnow, Petersen, et Nykjaer 2008). Contrairement aux autres membres de la famille LDLR majoritairement retrouvés à la surface cellulaire, SorLA serait retrouvé principalement au niveau du TGN et des endosomes et dans une moins grande mesure à la membrane plasmique. En fait, ce récepteur nouvellement synthétisé est dirigé du TGN vers la membrane plasmique via la voie constitutive, pour ensuite être rapidement internalisé vers les endosomes précoces et, sans atteindre les endosomes tardifs, retournerait rapidement vers le TGN (Willnow et al. 2010). Par la suite, SorLA effectuerait des cycles entre le TGN et les endosomes (Jacobsen et al. 2001 ; Andersen et al. 2005) grâce à son interaction avec les protéines adaptatrices GGA (Jacobsen et al. 2002 ; Schmidt et al. 2007) et le complexe rétromère (S. A. Small et al. 2005 ; S. A. Small et Gandy 2006 ; Rogaeva et al. 2007).

En janvier 2023, grâce à des données de cristallographie et d'intelligence artificielle, une équipe danoise propose la dimérisation de SorLA par l'intermédiaire de ses domaines 3Fn (fibronectine de type III) et Vps10p (Jensen et al. 2023). Cette dimérisation améliorerait le recyclage de  $\beta$ APP dépendant du rétromère en diminuant son clivage amyloïdogène.

Ainsi, SorLA est capable d'interagir avec la  $\beta$ APP (*Figure 24*) ainsi qu'avec BACE1 et d'en moduler le trafic intracellulaire (Andersen et al. 2006 ; Spoelgen et al. 2006). L'interaction de SorLA avec BACE1 peut faire compétition avec la  $\beta$ APP, réduisant le niveau d'interaction entre  $\beta$ APP et cette dernière (Spoelgen et al. 2006). SorLA joue un rôle clé dans le métabolisme de  $\beta$ APP en le redirigeant des endosomes (où a majoritairement lieu la voie amyloïdogène) (Andersen et al. 2006) vers l'appareil de Golgi, permettant son recyclage à la membrane plasmique (où a majoritairement lieu la voie non-amyloïdogène). Ainsi l'utilisation de cette voie métabolique permet une réduction de l'amyloïdogénèse. De plus, il a été montré que SorLA permettrait de rediriger le peptide  $A\beta$  vers le compartiment lysosomal et permettrait ainsi de réduire son accumulation. En somme, via 2 mécanismes, SorLA aurait un rôle protecteur en permettant de réduire la production du peptide  $A\beta$  (Andersen et al. 2005 ; Rogaeva et al. 2007 ; Dodson et al. 2008). SorLA agit donc à titre de récepteur de triage de la protéine  $\beta$ APP pouvant potentiellement être impliqué dans la MA (Andersen et al.

2005 ; Offe et al. 2006 ; Shah et Yu 2006 ; S. A. Small et Gandy 2006 ; Schmidt et al. 2007 ; Willnow et al. 2010). SorLA est aussi clivé par la  $\gamma$ -sécrétase, faisant compétition une fois de plus avec la  $\beta$ APP pour son clivage (Nyborg et al. 2006 ; Marzolo et Bu 2009). Enfin, l'équipe du Dr. Andersen a identifié 2 sites d'interaction entre SorLA et  $\beta$ APP, dont la localisation 316-498 (en aa) fait partie intégrante du fragment sAPP $\alpha$  (Andersen et al. 2006) et SorLA peut être clivée par TACE/ADAM17 sur un site proche de sa région transmembranaire, ce qui entraîne la libération d'une forme soluble (sSorLA) de sa région extracellulaire (Hermeijer et al. 2006).

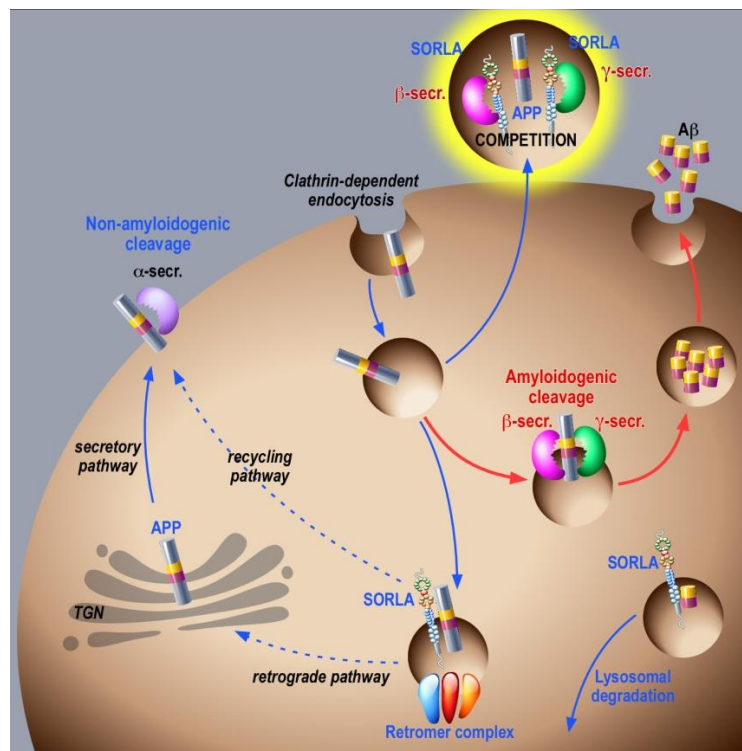


Figure 24 : Le rôle de la protéine SorLA dans le métabolisme de la protéine  $\beta$ APP (tiré de Campion et al, 2016)

En tant que récepteur de tri, SorLA limiterait la sécrétion de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  par la microglie, impactant fortement la progression des tumeurs cérébrales. En effet, une réduction des niveaux de SorLA augmente le potentiel pro-inflammatoire de la microglie, les souris SorLA $^{-/-}$  développant des tumeurs plus petites (Kaminska, Paulina et al. 2023).

SorLA est aussi un récepteur liant les lipoprotéines dont l'ApoE et il intervient dans son apport aux voies d'endocytose (Rogaeva et al. 2007). Ces études fonctionnelles sont en accord avec les études cas-témoins qui associent les variants PTV (pour Protein-Truncating Variants) et les variants faux-sens assimilés comme tels avec le risque de développer la MA (C. Pottier et al. 2012 ; G. Nicolas et al. 2016b).



Une étude réalisée chez des souris déficientes en *SORL1* retrouvait des concentrations élevées de peptide A $\beta$  (Dodson et al. 2008), tandis que d'autres études montraient que l'expression de l'ARNm de SorLA était diminuée dans le cerveau de sujets atteints de MA ((Scherzer et al. 2004 ; Dodson et al. 2006 ; Sager et al. 2007), tout comme celui des GGA et des protéines du complexe rétromère. Donc la perte de l'effet protecteur de SorLA provoquerait l'augmentation du clivage de  $\beta$ APP dans la voie amyloïdogène et de la production d'A $\beta$  (Dodson et al. 2008). De façon plus récente, une équipe a impliqué SorLA dans l'adressage du peptide A $\beta$  au lysosome favorisant sa dégradation (Caglayan et al. 2014 ; Dumanis et al. 2015). Dans un modèle de minipig, l'haploinsuffisance de *SORL1* entraîne une cytopathologie des endosomes (augmentation de leur taille), ainsi d'une augmentation des niveaux des biomarqueurs A $\beta$  et tau (Andersen et al. 2022).

Des études ont montré que certains variants de *SORL1*, entraînant une perte de fonction du gène, étaient considérés comme facteur de risque de survenue d'une MA (Rogaeva et al. 2007 ; Reitz, Brayne, et Mayeux 2011). Ces derniers ont également été retrouvés dans les cas de MA précoce, d'autant plus s'il existe des antécédents familiaux au premier degré (Gaël Nicolas et al. 2016a ; G. Nicolas et al. 2016b). Ainsi, des polymorphismes retrouvés dans le gène de *SORL1* ont été directement associés au développement de la MA (Rogaeva et al. 2007). Le Dr Lambert et ses collaborateurs ont montré que le SNP rs11218343 situé à proximité de *SORL1* était associé au risque de MA (Jean-Charles Lambert et al. 2013).

Grâce à une stratégie de récurrence, l'identification de variants rares de *SORL1* a été faite chez des patients atteints de formes familiales précoces de MA compatible avec un mode de transmission autosomique dominant (C. Pottier et al. 2012). L'objectif principal de cette étude était d'identifier de nouveaux variants rares à partir de familles présentant plusieurs cas familiaux de MA à début précoce compatible avec une transmission autosomique dominante mais non expliquée par une mutation d'*APP*, de *PSEN1* et *PSEN2*. En réalisant un séquençage de l'exome de 14 cas index non apparentés, le gène présentant la plus grande récurrence de variants rares était *SORL1* et concernait 5 des 14 patients (C. Pottier et al. 2012).

Dans une seconde cohorte de réplication indépendante comportant 15 nouveaux patients, il était retrouvé 2 autres individus porteurs de variants rares de *SORL1*. Toutefois, en l'absence de données de coségrégation, il reste impossible de considérer *SORL1* comme un nouveau gène de formes autosomiques dominantes. Par la suite, une étude d'association a été réalisée à partir de données d'exomes obtenues chez 484 cas de MA précoces et 498 contrôles. L'analyse de ces données a permis de valider les résultats initiaux révélant un enrichissement de variants rares assimilés à des pertes de fonction dans le gène *SORL1* chez les cas, proche de la significativité nécessaire en exome. L'analyse restreinte aux individus présentant une forme familiale précoce avait permis de franchir ce seuil de significativité (G. Nicolas et al. 2016b). Jusque-là, les études basées sur les variants rares avaient permis

d'identifier 2 variants dans les gènes *APP* et *TREM2* comme associés à la MA grâce à une stratégie complexe, avec l'accès à une cartographie du génome chez près de 100000 témoins, et les spécificités génétiques d'une population insulaire (Jonsson et al. 2012 ; 2013). Pour pallier la grande rareté des variants pris individuellement, la stratégie a été de cumuler les variants rares à l'échelle du gène entier, pour chacun des 20000 gènes du génome chez les cas, d'une part, et chez les témoins, d'autre part. Le gène *SORL1* présentait le niveau d'association le plus élevé : 24 variants de *SORL1* considérés biologiquement délétères par des logiciels de prédiction bio-informatiques, étaient retrouvés chez 28 patients contre seulement 1 variant de même nature chez 6 témoins. Depuis, ces résultats ont été répliqués dans une cohorte cas-témoins belge (Verheijen et al. 2016).

On comprend donc que les variants rares de *SORL1*, qui ont pour conséquence biologique une diminution de production d'une protéine fonctionnelle, favorisent le développement de la MA de façon directe (sur le peptide amyloïde A $\beta$ ) et indirecte (sur le métabolisme de  $\beta$ APP) (Caglayan et al. 2012 ; 2014). Il est intéressant de noter que ce même gène avait été identifié dans des approches par gènes candidats et en GWAS à la recherche de variants fréquents. Toutefois, la localisation en dehors des régions codantes du gène pour ces études et l'absence de déséquilibre de liaison entre les classes de variants rares et fréquents plaident pour un rôle distinct mais réel des 2 classes de variants dans la physiopathologie de la MA.

Récemment, une étude décrit 15 variants faux-sens rares de *SORL1*, sur les 70 étudiés et identifiés chez des patients Alzheimer, qui altéreraient la maturation et le trafic de la protéine SorLA. Ils ont montré que ces variants étaient largement retenus dans le RE, réduisant le transport de la protéine mature à la membrane plasmique et au système endosomal. L'analyse structurelle de l'impact des variants faux-sens sur la protéine SorLA suggère l'altération du trafic cellulaire de la protéine potentiellement due à de légères variations de sa structure 3D suite à des changements dans les interactions interatomiques (Rovelet-Lecrux et al. 2021). A la suite de cette étude, l'équipe a montré qu'une diminution de la température de croissance des cellules entraînait une augmentation significative de la maturation de SorLA pour 6 des 10 variants défectueux étudiés (Miguel et al. 2023).

## 8-Pyk2

A la fin de ma thèse, j'ai eu la possibilité, en collaboration avec le Dr J-C Lambert, d'étudier l'effet d'un mutant de Pyk2 sur le métabolisme de  $\beta$ APP mais aussi sur le suppresseur de tumeur p53. En effet, la protéine FERMT2, dont le gène est un facteur de risque identifié par GWAS au même titre que *PTK2B* pour Pyk2 et *SORL1* pour SorLA, a été caractérisé comme un partenaire direct de p53 (Sossey-Alaoui et al. 2019) et l'équipe du Dr Lambert étudie l'effet de l'inhibition de Pyk2 sur l'activation

de FERMT2. Ainsi, l'analyse en parallèle de Pyk2 et FERMT2 en lien avec p53 est potentiellement intéressante.

Pyk2 fait partie de la famille FAK qui désigne des protéines kinases non récepteurs cytoplasmiques. On y retrouve 2 membres : PTK2 (pour Protéine Tyrosine Kinase 2) et Pyk2 (ou PTK2B), qui sont liés à l'adhésion et la migration cellulaire via les intégrines (Mitra, Hanson, et Schlaepfer 2005). PTK2 et Pyk2 ont une homologie de séquence de 60%. Comme ce ne sont pas des récepteurs, ces protéines doivent être activées par des partenaires. On retrouve majoritairement ces kinases au sein de points d'adhésion focale : des complexes macromoléculaires réalisant un lien fonctionnel entre l'intérieur de la cellule et la matrice extracellulaire ou une cellule en contact. Il s'agit d'une protéine activée en aval des phénomènes d'adhésion (Hall, Fu, et Schaller 2011), elle est particulièrement bien placée pour agir en tant que médiateur des voies de signalisation déclenchées par l'adhésion. L'expression de Pyk2 a été reportée au sein de nombreux types cellulaires, les taux d'expression les plus forts étant présents dans les cellules des lignées hématopoïétiques et dans celles du SNC.

Des approches pharmacologiques, basées sur un inhibiteur (PF-431396), ont établi l'implication des tyrosines kinases FAK et Pyk2 dans la phosphorylation de tyrosines associée à la maturation des spermatozoïdes (capacitation) (González-Fernández et al. 2013 ; Battistone et al. 2014). Cependant les souris invalidées Pyk2 présentent une capacitation et une phosphorylation des tyrosines normales, démontrant la non spécificité de l'inhibiteur.

Le développement d'inhibiteur spécifique de Pyk2 a conduit à la résolution de sa structure par cristallographie. Cette protéine contient 3 domaines (*Figure 25*) : un domaine FERM (pour Four point-1, Ezrin, Radixin and Moesin) qui permet les interactions protéine-protéine, protéine-membrane et l'ancrage à la membrane, un domaine kinase qui contient la tyrosine 402 à l'origine de l'activation de Pyk2 par autophosphorylation, et le domaine C-ter qui est également à l'origine d'interactions protéine-protéine.

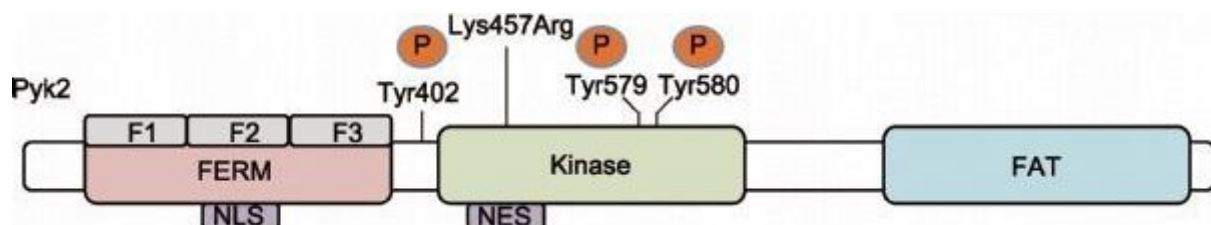


Figure 25 : La structure de la protéine Pyk2 (d'après Murphy et al, 2016)

Pyk2 est activée par plusieurs stimuli qui provoquent l'augmentation de la concentration du calcium  $Ca^{2+}$  intracellulaire, sans que les mécanismes exacts n'aient encore été découverts. Cette protéine est recrutée au niveau de la synapse

immunologique lors de sa formation, sans lien avec les radeaux lipidiques ou l'activité kinase de cette enzyme. Pour ce processus, il est nécessaire que la kinase Lck (pour Lymphocyte-specific protein tyrosine kinase) soit fonctionnelle, et qu'elle ait au moins un domaine ITAM (pour Immuno receptor Tyrosine-based Activation Motif) également fonctionnel. Toutefois, Lck n'est pas suffisante pour déclencher la relocalisation de Pyk2. ZAP70 (pour Zeta-chain-Associated Protein of 70 kDa) n'est en revanche pas nécessaire (Sancho et al. 2002). Les signaux d'adhésion peuvent agir comme co-stimulateurs et augmenter la sensibilité de l'activation des récepteurs des lymphocytes T, ce mécanisme est appelé AITCP (pour Adhesion Induced T Cell Priming ou sensibilisation du lymphocyte T induite par l'adhésion). L'AMPc (pour Adénosine MonoPhosphate cyclique) sert de messenger secondaire à ce processus : une hausse transitoire de sa concentration favorise la signalisation des récepteurs des lymphocytes T (Conche et al. 2009). Pyk2 est impliqué dans ce phénomène, en lien avec des kinases Src activées (Lck et Fyn) et la paxilline qui est reliée au cytosquelette. Un signal des récepteurs des lymphocytes T soutenu par un signal d'adhésion provoque une agrégation de ces protéines au niveau des points d'adhésion focale (Doucey et al. 2003).

Dans le contexte de la MA (*Figure 26*), la tyrosine kinase Pyk2 a été identifiée dans de multiples études GWAS comme un facteur de risque de la MA tardive (Jean-Charles Lambert et al. 2013 ; E. Lin et al. 2017) et au moins un variant de gène *PTK2B* est associé à la MA (rs28834970) (Chan et al. 2015). Le gène *PTK2B* interviendrait dans la migration cellulaire et la fonction synaptique. En effet, une étude rapporte que dans le modèle de souris transgénique APP/PS1 est observée une phosphorylation à la tyrosine 402 par Fyn (Higa- Nakamine et al. 2020) et un niveau accru de Pyk2 alors activée (Kaufman et al. 2015). Pyk2 jouerait un rôle crucial dans la perte synaptique et les troubles de la mémoire médiés par les oligomères A $\beta$  (A $\beta$ o) chez la souris (S. Lee et al. 2019).

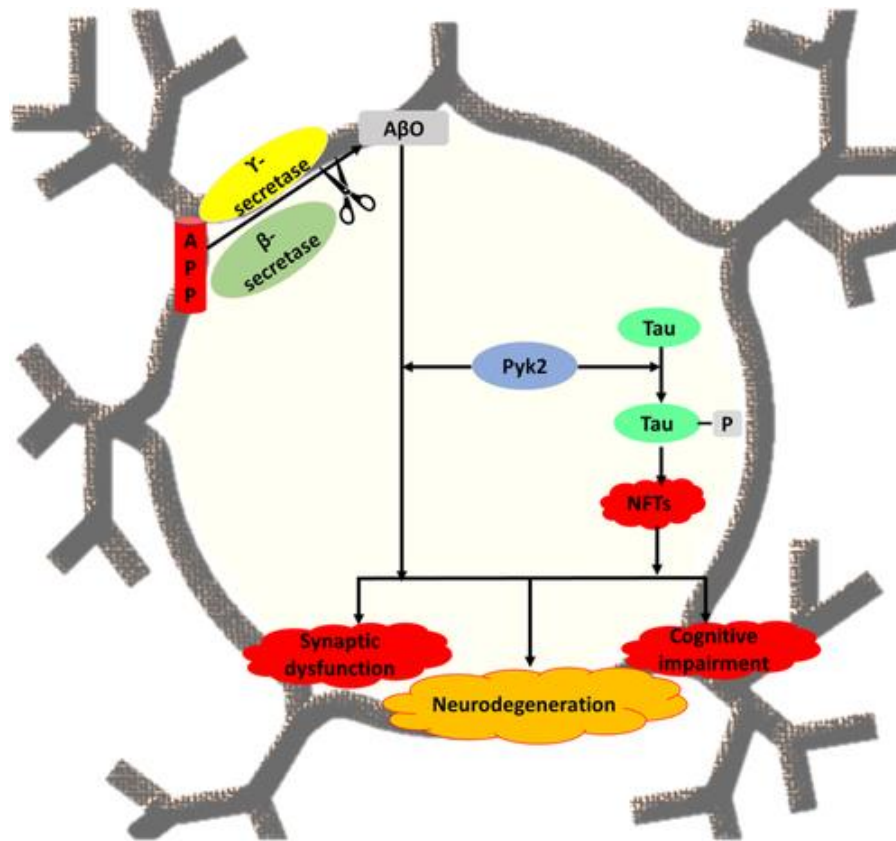


Figure 26 : Le rôle potentiel de la protéine Pyk2 dans la maladie d'Alzheimer (d'après Kumar et al, 2021)

Au contraire, une diminution modeste du niveau de Pyk2 actif a été rapportée dans le modèle de souris transgénique 5xFAD de la MA (Giralt et al. 2018). Les auteurs suggèrent que la surexpression de Pyk2 chez les souris 5xFAD améliore les altérations comportementales et histologiques. Ces différences pourraient s'expliquer par le fait que les souris APP/PS1 ne présentent pas de phénotype détectable avant 6 mois. En revanche, les souris 5xFAD présentent un phénotype plus agressif, dont les symptômes commencent à apparaître au cours du développement neurologique.

Dans un modèle de co-culture (synapses des neurones pré- et postsynaptiques) de la MA basé sur la microfluidique, il a été observé que la surexpression de Pyk2 protégeait les neurones de la neurotoxicité induite par le peptide Aβ (Kilinc et al. 2020). Pyk2 est apparu comme un substrat de la protéine STEP (pour Striatal-enriched protein Tyrosine Phosphatase) (J. Xu et al. 2012) qui contribue de manière significative à la physiopathologie de la MA (Kurup, Zhang, Venkitaramani, et al. 2010). En particulier, plusieurs rapports suggèrent une augmentation de l'expression de STEP dans la MA chez l'homme et dans les modèles murins (Kurup, Zhang, Xu, et al. 2010). L'inhibition de STEP augmenterait la phosphorylation de Pyk2 *in vivo* et améliorerait certains déficits cognitifs dans le modèle murin 3xTgAD de la MA, sans modification des taux d'Aβ et de phospho-tau (J. Xu et al. 2014).

Pyk2 est également susceptible d'être impliquée dans la tauopathie puisque tau est un substrat de Fyn (G. Lee et al. 1998 ; Gloria Lee et al. 2004 ; Kiran Bhaskar, Yen, et Lee 2005 ; K. Bhaskar et al. 2010) et de Pyk2 (C. Li et Götz 2018). Pyk2 colocalise avec la protéine tau hyperphosphorylée dans le cerveau de patients atteints de la MA et dans le modèle de souris transgénique tau pR5 (Köhler, Dinekov, et Götz 2013 ; P. Dourlen et al. 2017). Pyk2 peut également activer GSK3 $\beta$ , qui phosphoryle tau (Hooper, Killick, et Lovestone 2008). De plus, chez la drosophile, dFAK, l'unique orthologue de FAK et de Pyk2 chez les invertébrés, est un modulateur de la toxicité de tau (P. Dourlen et al. 2017).

Enfin, la PrPc, qui est un récepteur d'oligomères d'A $\beta$  (A $\beta$ o), s'associe au récepteur métabotrope du glutamate 5 (mGluR5) et, par son intermédiaire, à Homer1b/c, Pyk2 et CamKII (Haas et Strittmatter 2016 ; Haas et al. 2016 ; 2017). La signalisation par PrPc et mGluR5, qui comprend l'activation de Pyk2, est perturbée par les A $\beta$ o (Haas et Strittmatter 2016). Cette voie de signalisation PrPc-mGluR5 implique Fyn puisqu'un inhibiteur de Fyn bloque l'activation de Pyk2 et améliore l'apprentissage et la mémoire chez les souris Alzheimer (Kaufman et al. 2015). L'ensemble de ces résultats suggère que Pyk2 peut faire partie d'une cascade de signalisation en aval de mGluR5 qui est altérée par l'interaction d'A $\beta$ o avec la PrPc, alors qu'elle pourrait également contribuer à la tauopathie en régulant la phosphorylation de tau sur plusieurs sites. Pyk2 peut donc contribuer à différentes voies moléculaires pouvant rendre compte de l'évolution de la maladie. Toutefois, des travaux supplémentaires sont nécessaires pour mieux caractériser son rôle précis.

En ce qui concerne le lien potentiel entre Pyk2 et p53, il faut savoir que sa fonction dans le noyau n'est toujours pas claire. Au niveau nucléaire, Pyk2 a le potentiel de réguler p53 à la baisse en augmentant l'ubiquitination de p53 par son domaine FERM, et donc sa dégradation, ce qui favoriserait ainsi la survie cellulaire (Lim et al. 2008 ; 2010). En l'absence de stimulus, Pyk2 est principalement localisée dans le cytoplasme. Mais en réponse à un influx de calcium Ca<sup>2+</sup> (tel que la dépolarisation ou la stimulation des récepteurs NMDA), Pyk2 s'accumule dans le noyau où elle peut interagir avec des partenaires identifiés dans les cellules non neuronales dont p53.

## 9-OBJECTIFS

Le principal objectif durant mes 4 années de thèse a été d'étudier l'effet de 3 mutants de SorLA sur le métabolisme de  $\beta$ APP. En effet, seules des analyses « post-GWAS » peuvent confirmer les mécanismes moléculaires du gène *SORL1*, dont la protéine est initialement décrite comme récepteur endocytaire. Comme SorLA se lie à la protéine  $\beta$ APP et fonctionne comme un récepteur de tri intracellulaire, leur interaction dans les compartiments endosomaux limiterait l'amyloïdogénèse de  $\beta$ APP. On pense que des niveaux réduits de SorLA dans le cerveau modifient le

transport et le métabolisme de  $\beta$ APP pour augmenter la production de peptide A $\beta$  dans les endosomes. L'expression de SorLA serait normale dans la MA à transmission autosomale dominante mais diminuerait dans certains cas de MA sporadique à apparition tardive. Dans ces cas, l'hypothèse serait que la perte d'activité de SorLA est une cause proximale de l'amyloïdogénèse. En plus, certaines mutations faux-sens de SorLA, qui diminuent ses niveaux dans le cerveau, ont été trouvées dans de rares cas de MA familiale. Donc étudier 3 mutants de SorLA décrits comme impliqués dans des formes précoces de MA, sans mutation sur  $\beta$ APP, PS1 et PS2 (C. Pottier et al. 2012), permet d'affirmer ou non qu'ils modulent directement le métabolisme de la protéine précurseur du peptide amyloïde A $\beta$ .

Vers la fin de ma thèse, j'ai également pu étudier le facteur de risque PTK2B qui code pour la protéine Pyk2, une kinase non récepteur cytoplasmique. Aucune étude ne s'est déjà intéressée à l'effet de Pyk2 sur le métabolisme de  $\beta$ APP. Tout comme Pyk2 régulerait p53 et p53 régulerait  $\beta$ APP. Nous avons donc étudié le lien entre ces 3 protéines afin d'étudier l'hypothèse que Pyk2 interviendrait dans le métabolisme de  $\beta$ APP. Pour étendre nos recherches, nous avons en plus étudié la mutation du site d'autophosphorylation (Tyr402) de Pyk2 abolissant son activité kinase. Cette étude pourrait révéler un dialogue fonctionnel entre le facteur de risque Pyk2, le suppresseur de tumeur p53 et le précurseur du peptide A $\beta$ ,  $\beta$ APP.

## A- Objectif 1 :

En 2012, l'étude du génome par séquençage complet de 14 patients atteints de la MA a permis de découvrir 7 mutations du gène *SORL1* (Figure 27) dans certaines formes précoces. La réduction d'expression du récepteur SorLA dans la MA, exprimé plus particulièrement dans les neurones du SNC et périphérique, serait associée à la surproduction du peptide A $\beta$ .

Mon projet de recherche a consisté à étudier les conséquences biologiques et fonctionnelles de différentes mutations (SorLA<sup>141</sup>, SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup>) du gène *SORL1*, identifiées dans des formes précoces de MA, sur le métabolisme de la protéine  $\beta$ APP.

**Table 1** Unknown mutations identified in the *SORL1* gene

| Patients ID | cDNA level change | Protein level change | GERP score | Grantham score | Pathogenicity (MutationTaster) | Pathogenicity (PolyPhen2) | Pathogenicity (SIFT) | Segregation | Protein domain               |
|-------------|-------------------|----------------------|------------|----------------|--------------------------------|---------------------------|----------------------|-------------|------------------------------|
| ALZ 426     | c.422A>G          | Tyr141Cys            | 5.4        | 194            | Disease-causing (0.89)         | Probably damaging (1)     | Deleterious (0.04)   | N.A.        | VPS10p                       |
| EXT 049     | c.1531G>C         | Gly511Arg            | 5.44       | 125            | Disease-causing (0.85)         | Probably damaging (1)     | Deleterious (0.00)   | Yes         | VPS10p                       |
| EXT 181     | c.2771A>G         | Asn924Ser            | 5.53       | 46             | Disease-causing (0.81)         | Benign (0.332)            | Tolerated (0.15)     | N.A.        | LDLR, YWTD repeat            |
| EXT 077     | c.4073A>G         | Asn1358Ser           | -3.43      | 46             | Disease-causing (0.56)         | Benign (0.01)             | Tolerated (0.27)     | N.A.        | LDLR, class A repeats        |
| EXT 050     | c.4434C>A         | Cys1478X             | 1.37       | N.A.           | Disease-causing (1)            | N.A.                      | N.A.                 | N.A.        | LDLR, class A repeats        |
| ALZ 244     | c.5042G>A         | Gly1681Asp           | 5.77       | 94             | Disease-causing (0.63)         | Probably damaging (1)     | Deleterious (0.00)   | N.A.        | Fibronectin-type III repeats |
| EXT 017     | c.5463G>A         | Trp1821X             | 5.91       | N.A.           | Disease-causing (1)            | N.A.                      | N.A.                 | N.A.        | Fibronectin-type III repeats |

Abbreviations: GERP, Genomic Evolutionary Rate Profiling; LDLR, low-density lipoprotein receptor; N.A., not applicable.

## B- Résultats 1 :

Article : Potentially pathogenic *SORL1* mutations observed in autosomal-dominant cases of Alzheimer's disease do not modulate  $\beta$ APP physiopathological processing

7 mutations sur le gène *SORL1* codant pour la protéine SorLA ont été décrites comme impliquées dans les formes précoces de la MA autosomique dominante (C. Pottier et al. 2012). Nous avons examiné l'influence de 2 (SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup>) de ces 7 mutations (*Figure 25*) sur la maturation physiopathologique de  $\beta$ APP.

a- Expression et devenir des mutants de la protéine SorLA :

Dans la littérature, la protéine SorLA est décrite comme étant impliquée dans le trafic lysosomal de  $\beta$ APP (Andersen et al. 2005) et la forme APP-WT a un trafic différent de la forme APP-SWE (Christian Haass et al. 1995).

Nous montrons dans un premier temps que : 1) les constructions codantes pour les protéines SorLA<sup>WT</sup>, SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup> sont bien exprimées autant dans les cellules transfectées transitoirement HEK-293 naïves, HEK-293 APP-WT, HEK-293 APP-SWE et les cellules transfectées stablement CHO APP-WT et 2) les expressions de SorLA<sup>WT</sup>, SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup> sont potentialisées par l'inhibiteur de protéasome suggérant leur dégradation par ce dernier. 3) De manière intéressante, SorLA et  $\beta$ APP colocalisent au niveau subcellulaire et cette colocalisation est perturbée par les mutants SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup> (**Supplementary Figures 1 et 2**).

b- Influence de SorLA<sup>WT</sup> et de ses mutants sur l'expression de  $\beta$ APP et sur ses fragments non-amyloïdiques :

Nous observons une légère augmentation de l'expression de  $\beta$ APP endogène suite à la surexpression de SorLA<sup>WT</sup> dans les cellules HEK-293 et CHO (**Supplementary Figure 3**). Cependant, ni l'expression de  $\beta$ APP endogène, ni celle d'APP-WT, ni celle d'APP-SWE ne sont affectées par les mutations de SorLA. Nous montrons aussi que la sécrétion de sAPP $\alpha$  endogène est réduite dans les cellules surexprimant SorLA<sup>WT</sup> mais que cette baisse est similaire pour les mutants dans les cellules APP-WT transfectées transitoirement ou stablement (**Supplementary Figure 3**). Les mutations de SorLA n'affectent pas non plus la sécrétion de sAPP $\alpha$  dans les cellules APP-SWE par rapport à SorLA<sup>WT</sup>. Ces données sont confirmées par mesure fluorimétrique



directe de l'activité  $\alpha$ -sécrétase où aucune différence d'activité d' $\alpha$ -sécrétase entre SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants dans les cellules APP-WT et APP-SWE n'a été observée.

c- Influence de SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants sur le peptide A $\beta$  et sur l'expression et l'activité  $\gamma$ -sécrétase :

Nous avons d'abord mesuré la sécrétion du peptide A $\beta$  total dans les cellules APP-WT par immunoprécipitation. Comme décrit précédemment, la surexpression de SorLA<sup>WT</sup> réduit la sécrétion d'A $\beta$  total et cette baisse est similaire pour SORL<sup>511</sup> (**Supplementary Figure 4**). Nous avons ensuite mesuré les sécrétions respectives d'A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42 par ELISA. Cependant, nous n'avons pas observé de modification de la sécrétion des 2 formes d'A $\beta$  liées à SorLA, à l'exception du mutant SorLA<sup>924</sup> qui augmente légèrement l'A $\beta$ 42 mais pas l'A $\beta$ 40 (**Supplementary Figure 4**). Dans l'ensemble, les données ci-dessus sont confirmées dans les cellules HEK-293 APP-WT et APP-SWE transfectées transitoirement. Ni l'A $\beta$  total, ni l'A $\beta$ 40 et l'A $\beta$ 42, mesurés dans les sécrétats par ELISA, ne sont affectés par les mutations de SorLA dans les cellules APP-WT et APP-SWE. Nous avons enfin examiné les niveaux intracellulaires des peptides dans les cellules HEK-293 transfectées transitoirement. Comme attendu, le niveau d'A $\beta$ 42 intracellulaire par rapport à A $\beta$ 40 est considérablement augmenté. Cependant, là encore, les expressions de SorLA<sup>WT</sup> et de ses mutants n'affectent pas les niveaux intracellulaires d'A $\beta$ 40 et A $\beta$ 42.

Nous avons également confirmé l'absence d'effet des mutations de SorLA par rapport à la protéine sauvage sur la production du peptide A $\beta$  examinant l'expression de tous les membres du complexe  $\gamma$ -sécrétase et en mesurant son activité catalytique. Aucun des constituants n'est affecté par les mutations de SorLA par rapport à SorLA<sup>WT</sup>, dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE. Enfin, nous avons utilisé une procédure visant à reconstituer la  $\gamma$ -sécrétase fonctionnelle dans les membranes cellulaires pour mesurer son activité. Nos résultats montrent que l'expression des mutants de SorLA ne modifie pas l'activité  $\gamma$ -sécrétase par rapport à celle mesurée dans les cellules HEK-293 APP-SWE exprimant SorLA<sup>WT</sup>.

d- Influence de SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants sur les fragments C-ter de  $\beta$ APP et sur l'activité  $\beta$ -sécrétase :

Nous avons examiné l'influence potentielle de SorLA<sup>WT</sup> et de ses mutants sur les fragments carboxy-terminaux (APP C-ter) dans les cellules APP-WT transfectées stablement (**Supplementary Figure 3**). Dans ces cellules, SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants réduisent de façon similaire les expressions de C83 et C99. De même que dans les cellules transfectées transitoirement les expressions de C83 et C99 sont augmentées par la double mutation suédoise (APP-SWE). Cependant, dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE, SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants réduisent de façon similaire

l'expression de C83 et C99. L'alcalinisation par le NH<sub>4</sub>Cl a considérablement amélioré les expressions de C99 et C83 confirmant une dégradation lysosomale de ces fragments (Lauritzen et al. 2016). En revanche, le NH<sub>4</sub>Cl n'a pas affecté l'expression des composants de la  $\gamma$ -sécrétase dans les 2 lignées cellulaires (APP-WT et APP-SWE) quelle que soit la nature de SorLA exprimée. Cet ensemble de données a été renforcé par l'analyse fluorimétrique directe de l'activité de BACE1 où nous n'avons détecté aucune modulation de BACE1 par SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE.

e- Influence de SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants sur la néprilysine et la cathepsine B :

Nous avons évalué l'influence de SorLA<sup>WT</sup> et ses mutants sur les activités de la néprilysine et de la cathepsine B. L'absence de modulation des mutations de SorLA sur, respectivement, les activités de la néprilysine et de la cathepsine B dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE a été observée.

f- Discussion :

Le gène *SORL1* est le seul gène qui a été proposé pour contribuer à la fois aux formes précoces et aux formes tardives de la MA (Rogaeva et al. 2007). Les mutations associées à *SORL1* pourraient contribuer à la pathologie de la MA en modulant le trafic et le métabolisme de  $\beta$ APP. Afin de mieux comprendre les expressions et le devenir des mutants de SorLA, nous avons évalué l'influence de la lactacystine, un inhibiteur du protéasome (Fenteany et Schreiber 1998). Il a déjà été montré que ce composé affectait les protéines apparentées à  $\beta$ APP ou aux sécrétases (Dunys, Kawarai, Giaime, et al. 2007) (Checler et al. 2000). Nous avons observé une potentialisation de SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup> lors de l'inhibition du protéasome dans les cellules exprimant APP-WT et APP-SWE. Les expressions de SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup> n'ont pas affecté l'expression de  $\beta$ APP dans les modèles cellulaires transfectés transitoirement ou stablement par rapport à SorLA<sup>WT</sup>. Nos données obtenues par immunoempreintes tiennent compte de la quantité totale de  $\beta$ APP. Cependant, il est important de confirmer la localisation cellulaire de  $\beta$ APP et SorLA. Notre analyse immunocytochimique a établi d'une part que  $\beta$ APP et SorLA étaient effectivement colocalisées dans les cellules CHO transfectées stablement et, d'autre part, que les mutations 511 et 924 de SorLA modifiaient modérément cette colocalisation. Par conséquent, elles pourraient potentiellement perturber le recyclage de la protéine  $\beta$ APP en favorisant la voie amyloïdogène.

Bien que SorLA<sup>WT</sup> réduise les niveaux de sAPP $\alpha$  sécrété dans les 2 modèles cellulaires transfectés transitoirement et stablement, nous n'avons pas observé de modulation de sAPP $\alpha$  associée aux mutants de SorLA. Dans notre étude, pour renforcer nos observations, nous avons mesuré directement l'activité  $\alpha$ -sécrétase sur des cellules vivantes en plaque. Nous confirmons que l'activité  $\alpha$ -sécrétase et les

niveaux de C83 (la contrepartie C-ter de sAPP $\alpha$ , appelée  $\alpha$ -CTF) n'ont pas été modulés par les expressions de SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup>.



Dans l'ensemble, notre étude indique que SorLAWT ainsi que SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup> réduisent de manière similaire l'A $\beta$ 40 et l'A $\beta$ 42 intracellulaires et sécrétés dans les cellules transfectées transitoirement et stablement. Cette conclusion a été corroborée par 3 lignes de résultats indépendantes : 1) l'activité  $\beta$ -sécrétase n'était pas modulée par les mutants de SorLA ; 2) l'activité  $\gamma$ -sécrétase et les expressions de ses 4 composants protéiques n'ont pas été modifiées avec les expressions des mutants ; 3) l'expression de C99, qui est le précurseur du peptide A $\beta$ , n'est pas affectée par les mutants SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup>.

Enfin, nous avons analysé l'influence supposée des mutants de SorLA sur les événements se déroulant en aval de la production des catabolites de  $\beta$ APP. Le peptide A $\beta$  est principalement dégradé par la néprilysine tandis que les CTF (C99 et C83) subissent une protéolyse par des protéases lysosomales acides, incluant la cathepsine B. Comme cela est prévisible à partir de nos données décrites ci-dessus, les mutants de SorLA n'ont pas modifié l'activité de la néprilysine et de la cathepsine B. Ainsi, ni la production ni les mécanismes d'élimination ne sont affectés par les mutations SorLA examinées dans notre travail.

Notre étude n'exclut pas la possibilité que des mutations différentes puissent influencer le traitement physiopathologique de  $\beta$ APP. Cependant, nous pouvons conclure que nos mutations étudiées, rapportées être liées à des cas bénins (SorLA<sup>924</sup>) ou sévères (SorLA<sup>511</sup>) de MA, ne provoquent pas de phénotype pathogène supposé sur la modulation de la maturation physiopathologique de  $\beta$ APP. Encore une fois, cela n'exclut pas la possibilité que ces mutations déclenchent des phénotypes pathogènes en influençant d'autres voies cellulaires. En particulier, d'autres études restent à être réalisées pour évaluer l'influence possible de ces mutants sur la pathologie liée à tau ou sur l'atrophie de l'hippocampe, comme cela a été décrit pour un sous-groupe de mutants de *SORL1* (Louwersheimer et al. 2015).

Article

# Potentially Pathogenic *SORL1* Mutations Observed in Autosomal-Dominant Cases of Alzheimer's Disease Do Not Modulate APP Physiopathological Processing

Charlotte Bauer <sup>1</sup>, Eric Duplan <sup>1</sup> , Peter Saint-George-Hyslop <sup>2</sup> and Frédéric Checler <sup>1,\*</sup> 

<sup>1</sup> INSERM, CNRS, IPMC, Team Labeled "Laboratory of Excellence (LABEX) Distalz", Université Côte d'Azur, 660 Route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France; bauer@ipmc.cnrs.fr (C.B.); duplan@ipmc.cnrs.fr (E.D.)

<sup>2</sup> Center for Research in Neurodegenerative Diseases, Department of Medicine, Toronto Western Hospital Research Institute, University Health Network, University of Toronto, Toronto, ON M9G 1L7, Canada; p.hyslop@utoronto.ca

\* Correspondence: checler@ipmc.cnrs.fr; Tel: +33-4-93953460

**Abstract:** The *SORL1* gene encodes LR11/SorLA, a protein that binds  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) and drives its intracellular trafficking. *SORL1* mutations, occurring frequently in a subset of familial cases of Alzheimer's disease (AD), have been documented, but their pathogenic potential is not yet clear and questions remain concerning their putative influence on the physiopathological processing of APP. We have assessed the influence of two *SORL1* mutations that were described as likely disease-causing and that were associated with either benign (SorLA<sup>R24</sup>) or severe (SorLA<sup>S11</sup>) AD phenotypes. We examined the influence of wild-type and mutants SorLA in transiently transfected HEK293 cells expressing either wild-type or Swedish mutated APP on APP expression, secreted A $\beta$  and sAPP $\alpha$  levels, intracellular A $\beta$  40 and A $\beta$ 42 peptides, APP-CTFs (C99 and C83) expressions,  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases expressions and activities as well as A $\beta$  and CTFs-degrading enzymes. These paradigms were studied in control conditions or after pharmacological proteasomal modulation. We also established stably transfected CHO cells expressing wild-type SorLA and established the colocalization of APP and either wild-type or mutant SorLA. SorLA mutations partially disrupt co-localization of wild-type sorLA with APP. Overall, although we mostly confirmed previous data concerning the influence of wild-type SorLA on APP processing, we were unable to evidence significant alterations triggered by our set of SorLA mutants, whatever the cells or pharmacological conditions examined. Our study, however, does not rule out the possibility that other AD-linked *SORL1* mutations could indeed affect APP processing, and that pathogenic mutations examined in the present study could interfere with other cellular pathways/triggers in AD.

**Keywords:** *SORL1*; mutations; secretases; APP; A $\beta$  peptides; C-terminal fragments; neprilysin; proteasome; degradation; cellular localization; transient and stable expressions



Citation: Bauer, C.; Duplan, E.; Saint-George-Hyslop, P.; Checler, F. Potentially Pathogenic *SORL1* Mutations Observed in Autosomal-Dominant Cases of Alzheimer's Disease Do Not Modulate APP Physiopathological Processing. *Cells* 2023, 12, 2802. <https://doi.org/10.3390/cells12242802>

Academic Editor: Jacques P. Tremblay

Received: 29 September 2023  
Revised: 24 November 2023  
Accepted: 6 December 2023  
Published: 8 December 2023



Copyright © 2023 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 (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a complex pathology characterized by either early or late onsets. Most of early onset (EOAD) cases are of familial origin and follow an autosomal dominant transmission [1–3], while late onset (LOAD) cases usually referred to as sporadic AD cases have been shown to be associated with various risk factors [4,5]. The recent occurrence of genome wide association studies allowed elucidating some of these risk factors [6,7]. Indeed, cohorts built with a growing number of cases coupled to powerful bioinformatics allowed analysis of this bulk data and led to a still increasing number of gene candidates that could underlie individual susceptibility to AD pathology.

Contradicting the apparent dichotomy between familial and sporadic AD cases, *SORL1* gene has been implicated in both EOAD and LOAD. Thus, Rogeava and Colleagues [8]

first evidenced a genetic link between *SORL1* and AD. This was further corroborated by independent meta-analyses confirming the link between *SORL1* variants and sporadic AD cases [9–11]. Interestingly, exome sequencing also delineated *SORL1* mutations in both EOAD and LOAD cases [12,13].

*SORL1* encodes a sortilin-related receptor with A-type repeats named SorLA (also referred to as LR11) [8]. This protein has been characterized as a neuronal sorting receptor for  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP), the precursor of A $\beta$  peptides that accumulate in AD-affected brains [14]. The ability of SorLA to physically interact with APP drives its lysosomal sorting and was shown to be affected by familial AD mutations [13,15]. This was reported to yield functional consequences on the levels of A $\beta$  load in cells [13,16] and animals [15]. However, it appears that the phenotypic alterations on A $\beta$  peptides levels as well as the nature of A $\beta$  peptides modified varied according to the degree of rarity of the *SORL1* variants [16] as well as cellular and experimental settings. Indeed, unlike in the present work, no studies exhaustively examined the direct influence of SorLA mutations on other steps of the APP physiopathological maturation.

Here, we exhaustively examined the influence of two frequent *SORL1* mutations linked to either benign or severe autosomal dominant cases of AD on the amyloidogenic and non-amyloidogenic APP products, secretases expressions and activity and A $\beta$  degradation processes.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Constructs and Site-Directed Mutagenesis

Wild-type human *SORL1* cDNA, cloned in the pcDNA3.1 (+) vector, was provided by one of us (P. St. G-H). Site-directed mutagenesis kits from Agilent (Santa Clara, CA, USA, QuikChange II) and mutagenesis primers (Eurogentec, Seraing, Belgium) were used to obtain the SorLA<sup>G511</sup> and SorLA<sup>N924S</sup> mutants (Table 1). All nucleotides modifications were verified by full sequencing of the constructs.

**Table 1.** Point mutations in bold and corresponding mutant.

| hSORL1 Point Mutation (Nucleotide) | Forward Primer   | hSorLA Point Mutation (Amino Acid) |
|------------------------------------|--|------------------------------------|
| G1531C                             | 5'-GGC-YCA-GTG- <b>CGA</b> -AAG-AAC-TTG-GCT-AGC-AA-3'  | G511R                              |
| A2771G                             | 5'-GAT-GTG-AAG-TGG- <b>CCC</b> -AGT-GGC-ATC-TCT-GTG-3' | N924S                              |

### 2.2. Cell Cultures and Transfections

Human Embryonic Kidney 293 cells (HEK293) expressing wild-type APP (wt-APP) or swedish-mutated APP (swe-APP) were cultured (5% CO<sub>2</sub>, 37 °C) in DMEM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) containing Fetal Bovine Serum (FBS 10%, Sigma, St. Louis, MO, USA) and antibiotics (50 U/mL penicillin/50  $\mu$ g/mL streptomycin, Invitrogen). Wild-type or mutant *SORL1* cDNA were transiently transfected (24 h) using the jetPRIME reagent (Polyplus, Strasbourg, France) (2  $\mu$ g or 10  $\mu$ g of cDNA in 35 mm or 100 mm dishes, respectively) in control or inhibitor conditions (lactacystin, 5  $\mu$ M). In alkalizing conditions, cells were treated for 16 h at 37 °C with NH<sub>4</sub>Cl (10 mM). Chinese Hamster Ovary cells (CHO) expressing wt-APP were obtained by stable transfection of the pcDNA4 vector [17]. Cells were maintained in DMEM containing 10% FBS, sodium hypoxanthine-thymidine supplement, and 300  $\mu$ M proline. Cells were stably transfected with 2  $\mu$ g of wild-type or mutants *SORL1* cDNA according to Lipofectamine protocols (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Clones were selected with 250  $\mu$ g/mL Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA).



### 2.3. Cells Immunostaining

CHO cells grown on coverslips were fixed in paraformaldehyde 4% solution for 10 min, permeabilized with Triton-X 100 (0.1%) for 10 min, saturated in BSA (5%)/Tween20 (0.1%), and probed for 1 h with appropriate primary antibodies:  $\beta$ -Amyloid (clone 6E10, Sigma, St. Louis, MO, USA) mouse monoclonal (1:1000) or SorLA rabbit polyclonal (1:1000, Sigma, St. Louis, MO, USA). After washes, coverslips were incubated for 1 h with Alexa Fluor-488 and Alexa Fluor-594 conjugated antibodies (Molecular Probes, Eugene, OR, USA, 1:1000) and DAPI (1:20,000, Roche, Basel, Switzerland) staining. Finally, the sections were washed with PBS, then mounted onto glass slides and cover-slipped. The stained slices were kept at 4 °C before analysis with confocal microscopy (Zeiss LSM 780 with 63X Objective).

### 2.4. sAPP $\alpha$ Secretion And Immunoprecipitation of Total Secreted A $\beta$

Cells were grown in 6-well plates and allowed to secrete A $\beta$  for 16 h in OptiMEM (1 mL, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) + 1% FBS (Sigma, St. Louis, MO, USA) containing phosphoramidon (10  $\mu$ M, Sigma, St. Louis, MO, USA) in order to prevent A $\beta$  degradation by neprilysin as described [18]. Media were collected, completed with one tenth of 10X RIPA buffer (Tris-HCl pH 8.0 (100 mM) containing NaCl (1.5 M) and EDTA (50 mM)). sAPP $\alpha$  secretion was measured in 20  $\mu$ L of medium collected and deposited on an 8% Tris-Glycine gel. For A $\beta$  immunoprecipitation, the remaining secretate was incubated overnight with a 100-fold dilution of 6E10 (Eurogentec, Seraing, Belgium) and protein A agarose beads (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Beads were washed twice with 1X RIPA and subjected to Tris/tricine 16.5% polyacrylamide gel. Proteins were transferred onto nitrocellulose membranes and incubated overnight with the 6E10 monoclonal antibody at a 1/1000 dilution. Immunological complexes were detected with a goat anti-mouse peroxidase-conjugated antibody (1/2000 dilution). Chemiluminescence was recorded using a Luminescence Image Analyser LAS-4000 (FujiFilm, Tokyo, Japan) and quantifications were performed using the MultiGAUGE analyser software V3.0.

### 2.5. Sandwich ELISA of Secreted and Intracellular A $\beta$

Cells were grown in 6-well plates and allowed to secrete A $\beta$  as described above. Intracellular A $\beta$  peptides were recovered as described [19]. A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 were measured using human A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 ELISA kits (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The minimal detectable amount of human A $\beta$ 42 is <10 pg/mL and human A $\beta$ 40 is <6 pg/mL.

### 2.6. Western Blotting

SorLA, neomycin, APP, sAPP $\alpha$ , CTFs and  $\beta$ -tubulin were separated on Tris-glycine (8%) or Tris-tricine (16.5%) gels. Proteins were transferred onto Hybond-C membranes (GE Healthcare, Boston, MA, USA) and then probed with the following antibody: anti-SorLA (antibodies-online, Aachen, Germany), anti-neomycin (Merck Millipore, Darmstadt, Germany), 22C11 (anti-N-terminal sequence of APP), 2H3 (anti-human A $\beta$  targeting sequence 1–12 that reacts with the N-terminus of sAPP $\alpha$  but not sAPP $\beta$ ); BR188 (anti-C-terminal sequence of APP provided by Dr. M. Goedert); anti-PS1-NT raised against residues 1–65 of human PS1 (kind gift from Dr. Fraser); anti-PS2-Loop raised against residues 269–394 corresponding to the from the intracellular loop region of human PS2 (provided by Dr. Thinakaran); anti-APH1aL raised against the C-terminal region of human APH1aL (kind gift from one of us, PSGH); anti-PEN2 raised against the last 24 amino acids of human PEN2 (CR8, Covance); anti-nicastrin was a goat polyclonal antibody raised against the N terminus of human nicastrin (sc-14369, Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA); anti- $\beta$ -tubulin (Sigma, St. Louis, MO, USA). Immunological complexes were revealed with either anti-mouse or anti-rabbit peroxidase antibodies (Beckman Coulter, Fullerton, CA, USA), followed by electrochemiluminescence.

### 2.7. *In Vitro* $\gamma$ -Secretase Assay

The  $\gamma$ -secretase assay by means of reconstituted membranes was carried out as described previously [20]. An equal amount of membranes preparations was incubated overnight with a recombinant C100-FLAG corresponding to the  $\beta$ -secretase-derived APP fragment harboring a methionine residue in position 1 [20]. A $\beta$  and AICD-FLAG were detected by Western blotting on a 16.5% Tris/tricine gel and revealed with either anti-A $\beta$  2H3 or anti-FLAG antibodies, respectively.

### 2.8. BACE1 Fluorimetric Assay

BACE1 activity was followed with (7-methoxycoumarin-4-yl)-acetyl-SEVNLD AEFK(2,4-dinitrophenyl)-RRNH<sub>2</sub>; 10  $\mu$ M, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in absence or in the presence of  $\beta$ -secretase inhibitor I (50  $\mu$ M, PromoCell, Heidelberg, Germany) as described previously [21]. BACE1 activity corresponds to the  $\beta$ -secretase inhibitor-sensitive fluorescence recorded at 320 and 420 nm as excitation and emission wavelengths, respectively.

### 2.9. $\alpha$ Secretase Activity on Intact Cells

Plated confluent HEK293 cells were pretreated for 30 min at 37 °C with 1 mL of PBS supplemented with or without the zinc metalloprotease inhibitor *o*-phenanthroline (100  $\mu$ M), then the quenched fluorimetric  $\alpha$ -secretase substrate JMV2770 (10  $\mu$ M, provided by Dr. Hernandez) was directly added to the cultured cells for various times as described [22]. At each incubation time period, medium (100  $\mu$ L) was collected and fluorescence was recorded in a 96-wells plates at 320 and 420 nm as excitation and emission wavelengths, respectively. After removal of the last sample, cells were resuspended in lysis buffer (10 mM Tris/HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.5% Triton X-100, 0.5% deoxycholate, and 5 mM EDTA); protein concentrations were determined by the Bradford method [23], and all fluorimetric values were normalized according to protein contents.

### 2.10. Neprilysin Activity Measurements

Neprilysin (NEP) activity was followed as described previously [24]. Briefly, cell homogenate samples (50  $\mu$ g of proteins) were incubated in a final volume of 100  $\mu$ L containing NEP substrate (Suc-Ala-Ala-Phe-7AMC, 20  $\mu$ M, Sigma, St. Louis, MO, USA) in the absence or presence of the NEP inhibitor phosphoramidon (10  $\mu$ M, Sigma, St. Louis, MO, USA). NEP activity was considered as the phosphoramidon-sensitive fluorescence recorded at 390 and 460 nm as excitation and emission wavelengths.

### 2.11. *In Vitro* Cathepsin B Activity Assay

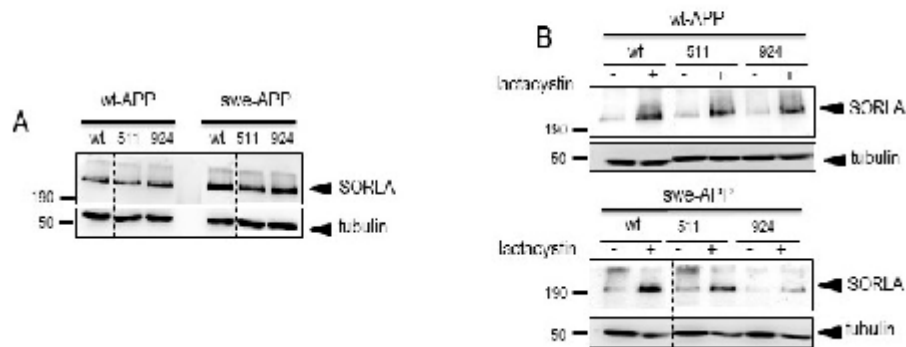
HEK293 cells were lysed mechanically in homogenization buffer (250 mM sucrose, 1 mM EDTA, 5 mM Hepes pH 7.4) using, firstly, a Dounce homogenizer, then a syringe. The cell suspension was centrifuged for 5 min at 850  $\times$  g, then the resulting supernatant was further centrifuged for 90 min at 20,000  $\times$  g. The pellet (membrane-enriched fraction) was resuspended in Tris-HCl (10 mM, pH 7.5) and all samples were adjusted to 6  $\mu$ g/ $\mu$ L before analysis. Cathepsin B activity was monitored as described [19] by incubating samples (60  $\mu$ g of protein extracts) in a final volume (100  $\mu$ L) of acetate buffer (25 mM, pH 5.5, L-cysteine HCl, 8 mM) containing cathepsin B substrate (carboxybenzoyl-Arg-Arg-7-Amido-4-methylcoumarin (100  $\mu$ M, Sigma, St. Louis, MO, USA) in the absence or presence of leupeptin (10  $\mu$ M, Sigma, St. Louis, MO, USA). Specific cathepsin B activity was considered as the leupeptin-sensitive fluorescence recorded at 320 nm (excitation) and 420 nm (emission) using a fluorescence plate reader (FLUOstar Omega, BMG Labtech, Ortenberg, Germany). Fluorescence was recorded every 5 min during 150 min and cathepsin B activity was calculated as the slope in initial velocity conditions, i.e., in the linear part of the curve corresponding to the initial 30 min.

### 2.12. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed with PRISM Software V8.0.1 (Graph-Pad Software, San Diego, CA, USA) by using the unpaired Student's *t*-test for pairwise comparisons.

### 3. Results

Expression and fate of SorLA mutant proteins in wt-APP- and swe-APP-expressing cells. Since SorLA protein is involved in APP lysosomal sorting [25] and because wt-APP and swe-APP traffic differently [26], we have first examined the influence of *SORL1* mutations on APP physiopathological maturation in both wt-APP- and swe-APP-expressing HEK293 cells. First, we assessed wt and mutant SorLA expressions after *SORL1* cDNA transient transfection. We show that wt, SorLA<sup>S11</sup> and SorLA<sup>924</sup> were similarly expressed in wt- or swe-APP cells (Figure 1A, upper panel). We envisioned the possibility that the proteasome could contribute SorLA degradation. Lactacystin, a proteasome inhibitor [27] that potentiates the recovery of AD-related proteins [28,29] indeed enhances wt, SorLA<sup>S11</sup> and SorLA<sup>924</sup> expressions in both wt- and swe-APP cells (Figure 1B).

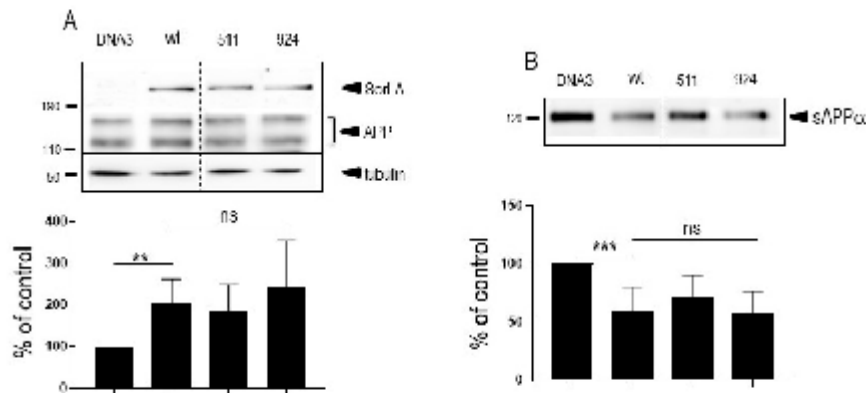


**Figure 1.** Wild-type and mutated SorLA expressions and fate in wt-APP- and swe-APP-expressing HEK293 cells. cDNA encoding wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>S11</sup> or SorLA<sup>924</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP- or swe-APP- expressing HEK293 cells (A) in absence (–) or in the presence (+) of lactacystin (B) as described in experimental procedure. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested then SorLA and tubulin expressions were monitored by Western blot as described in the procedures. Gels correspond to one representative blot of 2 to 5 independent analyses. All full gels are shown in a Supplementary Material.

Interestingly, as previously described [16], wt-APP expression appeared increased by wt-SorLA expression, but this augmentation was not potentiated by SorLA mutations (Figure 2A).

In order to confirm these observations, we established stable transfected CHO cells expressing either wild-type or mutated SorLA. In agreement with the above-described data, we detected clones expressing wt-SorLA, SorLA<sup>S11</sup> and SorLA<sup>924</sup> proteins (selected clones for further analyses are indicated in red circles (Supplementary Figure S1A,B)) the expressions of which were enhanced by the proteasome inhibitor MG132 (Supplementary Figure S1C).



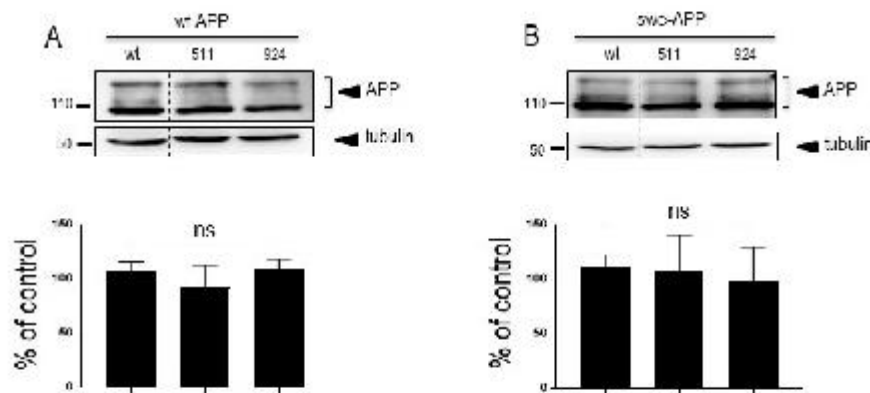


**Figure 2.** Influence of wild-type and mutated SorLA on endogenous wt-APP expression and secreted sAPP $\alpha$ . Empty pcDNA3 (DNA3), wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>511</sup> or SorLA<sup>924</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP-expressing HEK293 cells (A). Twenty-four hours after transfection, secretates were recovered then cells were harvested and sAPP $\alpha$  and APP expressions were monitored by Western blot as described in experimental procedures. Bars are densitometric analyses expressed as percent of control (DNA3)-transfected cells taken as 100 and are the means  $\pm$  SEM of 3 (A) or 4 (B) independent determinations. \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns, non-statistically significant. All full gels are shown in Supplementary Materials.

These stably transfected cells also proved useful to examine the putative co-localization of SorLA proteins with wt-APP (see expressions of wt-APP in Supplementary Figure S1A–C). Supplementary Figure S1A–C (lower panels) indicates that wt-SorLA, SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>924</sup> were readily detectable in these cells and colocalized with wt-APP (Supplementary Figure S1A,B, see merge panels). Closer analysis of wt-APP and wt-SorLA colocalization indicates that both are readily detectable in intracellular vesicular structures, identifiable by punctiform labeling in the cell cytoplasm (Supplementary Figure S2, right panels) and that this colocalization appears to be partly disrupted when SorLA is mutated at 511 or 924 (Supplementary Figure S2, left panel). This above set of data concludes that: (1) wt, SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>924</sup> expressions are not modulated by the nature of the APP expressed (wt- or Swe-APP) nor by the cell type and transfection procedures (transient transfection in HEK293 or stable transfection in CHO); (2) wt, SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>924</sup> expressions are potentiated by proteasome inhibitors; (3) wt-APP and SorLA co-localize at a subcellular level and 511 and 924 SorLA mutations reduce this colocalization.

### 3.1. Influence of Wild-Type SorLA and Its Mutants on Endogenous APP Expression and on Its Non-Amyloidogenic Proteolysis

Since SorLA modulates APP trafficking, we first examined whether cellular expressions of wt-APP and/or swe-APP could be affected by SorLA mutations in transiently transfected HEK293 cells. We first observed a slight but statistically significant increase in endogenous wt-APP expression triggered by wt-SorLA expression (Figure 2A). These data appear similar in stably transfected cells, which display an increased wt-APP expression linked to wt-SorLA expression (Supplementary Figure S3A). However, neither endogenous APP (Figure 2A), overexpressed wt-APP (Figure 3A) nor swe-APP (Figure 3B) expressions were affected by SorLA mutations in both transient (Figures 2 and 3) and stable (Supplementary Figure S3A) transfectants.



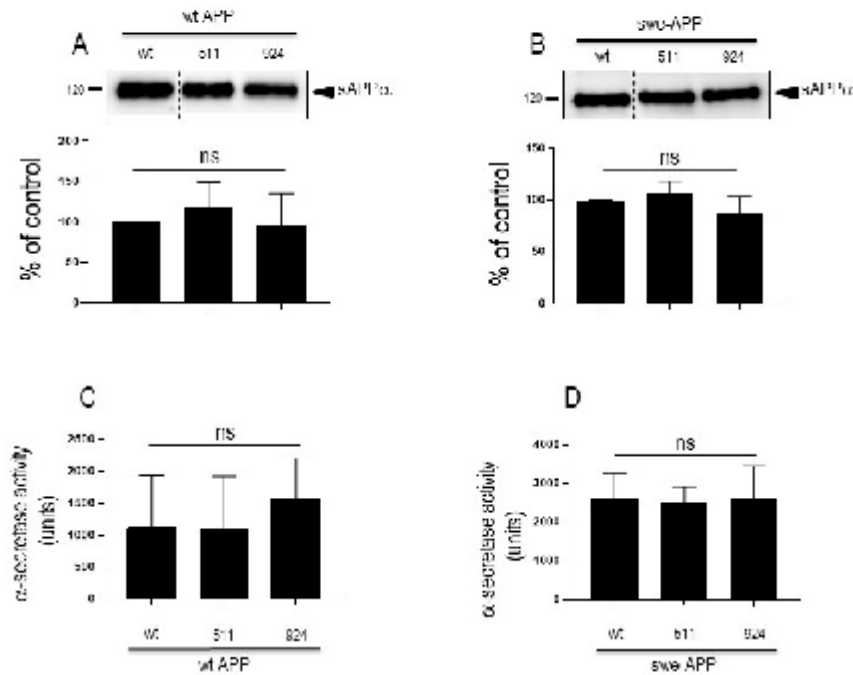
**Figure 3.** Influence of wild-type and mutated SorLA on wt-APP and swe-APP expressions. cDNA encoding wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>511</sup> or SorLA<sup>924</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP (A) or swe-APP (B) expressing HEK293 cells. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested then APP expression was monitored by Western blot as described in experimental procedures. Bars are densitometric analyses expressed as percent of control (SorLA<sup>wt</sup> cDNA transfection in corresponding cells) and are the means  $\pm$  SEM of 3 (A) or 4 (B) independent determinations. ns, non-statistically significant. All full gels are shown in Supplementary Materials.

APP undergoes both constitutive and regulated non amyloidogenic processing by  $\alpha$ -secretase, which leads to sAPP $\alpha$  secretion and concomitant formation of its C-terminal counterpart C83. We show that endogenous secreted sAPP $\alpha$  was reduced in cells overexpressing wt-SorLA (Figure 2B). As expected, wt-APP expression increases sAPP $\alpha$  in stably transfected cells (compare mock and DNA3 lanes in Supplementary Figure S3B). Of note, the recovery of endogenous sAPP $\alpha$  (Figure 2B) or sAPP $\alpha$  in both stably (compare DNA3 and mutant lanes in Supplementary Figure S3B) and transiently (Figure 4A) transfected cells expressing APP were similarly reduced by wt and mutated SorLA. SorLA mutations also did not affect sAPP $\alpha$  recovery in swe-APP-expressing cells (Figure 4B). This set of data indicating a lack of influence of SorLA mutations on the non-amyloidogenic pathway of APP was further confirmed by direct fluorimetric measurement of  $\alpha$ -secretase activity by recording the phenanthroline-sensitive JMVZ770-hydrolyzing activity [22] on intact wt- and swe-APP cells. Thus, no difference in  $\alpha$ -secretase activity in wt- and swe-APP plated cells was observed (Figure 4C,D).

### 3.2. Influence of Wild-Type SorLA and Its Mutants on A $\beta$ Peptides and $\gamma$ -Secretase Expression and Activity

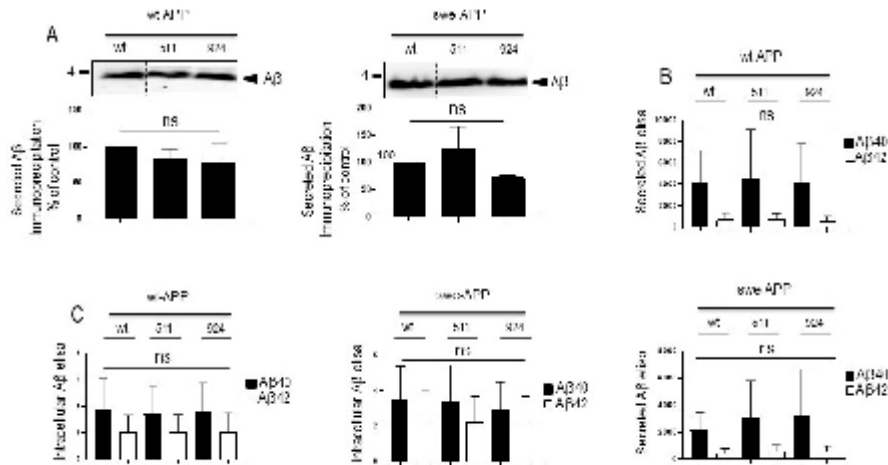
We aimed at examining the influence of SorLA on A $\beta$  production/recovery in our transient and stably transfected cells. We first measured total A $\beta$  peptides recovery in secretates of wt-APP-expressing cells by immunoprecipitation (Supplementary Figure S4A) in the presence of the inhibitor phosphoramidon in order to prevent neprilysin-dependent degradation of A $\beta$  peptides [24,30–32]. As previously reported, wt-SorLA reduces total A $\beta$ , the recovery of which was similarly triggered by SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>141</sup> (Supplementary Figure S4A). It is well known that A $\beta$  is mainly a mix of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42, in which the latter accounts for about 10% of total A $\beta$  and that slight modifications of A $\beta$ 42/40 ratio could drive toxic phenotypes in cells [33]. Since the tiny modulation of A $\beta$ 42 could have been underscored in the total A $\beta$  immunoprecipitation procedure, we have delineated the respective levels of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 by sensitive ELISA. As previously described, A $\beta$ 42 levels correspond to about 10–15% of A $\beta$ 40 (compare values in DNA condition in Supplementary Figure S4B,C). However, we did not observe SorLA-related modifications of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 recoveries, except for the 924 SorLA mutant that triggers a faint increase of secreted

A $\beta$ 42 (Supplementary Figure S4C) but not A $\beta$ 40 (Supplementary Figure S4B). Overall, the above data were confirmed in wt-APP-expressing transient transfectants. Thus, neither total A $\beta$  (Figure 5A) nor A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 (Figure 5B) measured in secretates by ELISA were affected by SorLA mutations in APP expressing cells (Figure 5A,B). Total secreted A $\beta$  was also not affected by SorLA mutants in swe-APP-expressing cells (Figure 5A).



**Figure 4.** Influence of wild-type and mutated SorLA on secreted sAPP $\alpha$  and  $\alpha$ -secretase activity. cDNA encoding wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>S11</sup> or SorLA<sup>S24</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP- (A,C) or swe-APP- (B,D) expressing HEK293 cells. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested then sAPP $\alpha$  expression was measured in secretates (A,B) by Western blotting as described in the experimental procedures. Bars correspond to densitometric analysis of sAPP $\alpha$  expressed as percent of control (sAPP $\alpha$  in SorLA<sup>wt</sup>-expressing cells) and are the means  $\pm$  SEM of 5 (A) or 4 (B) independent experiments. In C and D,  $\alpha$ -secretase activity was fluorimetrically recorded on plated cells as described in the experimental procedure. Bars correspond to the phenanthroline-sensitive JMV2770-hydrolysing activity and are the means  $\pm$  SEM of 9 (C) and 5 (D) independent experiments. ns, non-statistically significant.

A $\beta$  peptides can also aggregate and settle intracellularly [34]. Noticeably, A $\beta$ 42 is particularly prone to aggregation and its intracellular proportion relative to total A $\beta$  is augmented. We thus examined the levels of both intracellular A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 peptides in transiently transfected cells. As expected, intracellular A $\beta$ 42 levels relative to A $\beta$ 40 are drastically increased (compare black and empty bars in wt condition in Figure 5C). However, here again, wt- and mutant SorLA-expressions did not affect intracellular levels of A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42, whatever the APP species examined (Figure 5C).

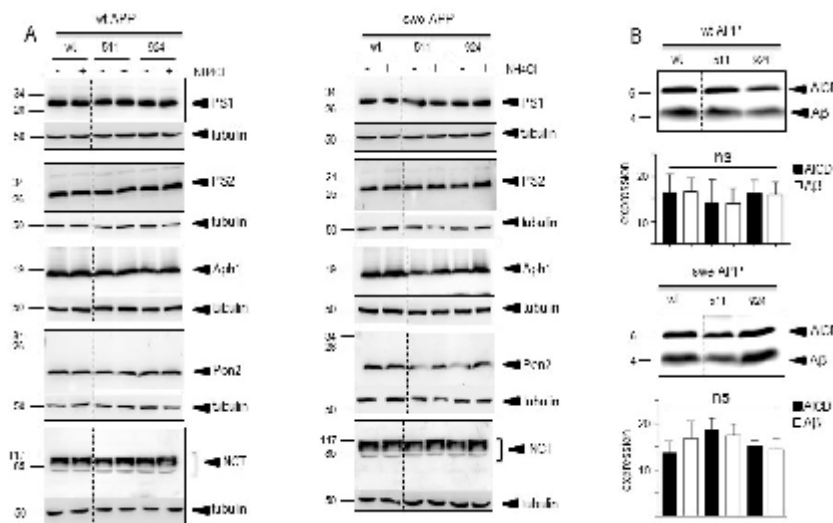


**Figure 5.** Influence of wild-type and mutated SorLA on secreted and intracellular A $\beta$  peptides. cDNA encoding wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>S11</sup> or SorLA<sup>Q24</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP- or swe-APP-expressing HEK293 cells (A–C). Twenty-four hours after transfection, total A $\beta$  (A) recovered in medium was analyzed by immunoprecipitation (A). Bars are densitometric analyses expressed as percent of control (densitometries in SorLA<sup>wt</sup>-expressing cells) and are the means  $\pm$  SEM of 3 experiments. In B and C, cells were analyzed for secreted (B) or intracellular (C) A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 (C) by ELISA as described in the experimental procedures. ELISA quantifications are the means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. ns, non-statistically significant. All full gels are shown in Supplementary Materials.

The last proteolytic step yielding A $\beta$  peptides is accounted for by  $\gamma$ -secretase, a heterotetrameric complex composed of Aph1, nicastrin, Pen-2 and presenilin 1 or 2 that harbors the catalytic core [35–39]. Thus, we attempted to confirm the lack of effect of SorLA proteins on secreted and intracellular A $\beta$  by examining the expression of all components of the  $\gamma$ -secretase complex and by measuring its catalytic activity. Figure 6A clearly shows that none of the components expression was affected by wt- of SorLA mutants, in both wt- and swe-APP-expressing cells. Finally, we have previously reported a procedure aimed at reconstituting functional  $\gamma$ -secretase in cell membranes and by measuring its activity by means of recombinant C100 [20]. This fragment, which corresponds to  $\beta$ -secretase-derived cleavage of APP (to which a N-terminal methionine has been added, see Experimental procedure), allows monitoring A $\beta$  peptides and their corresponding C-terminal counterpart AICD productions upon  $\gamma$ -secretase cleavage only [20]. Figure 6B indicates that expressions of wt and mutated SorLA do not affect  $\gamma$ -secretase activity measured in swe-APP-expressing cells.

Overall, the above-described data obtained by multiple and complementary approaches consistently demonstrate that SorLA mutations do not affect secreted A $\beta$  and intracellular A $\beta$ 40/42, and do not modulate  $\gamma$ -secretase expression and activity.



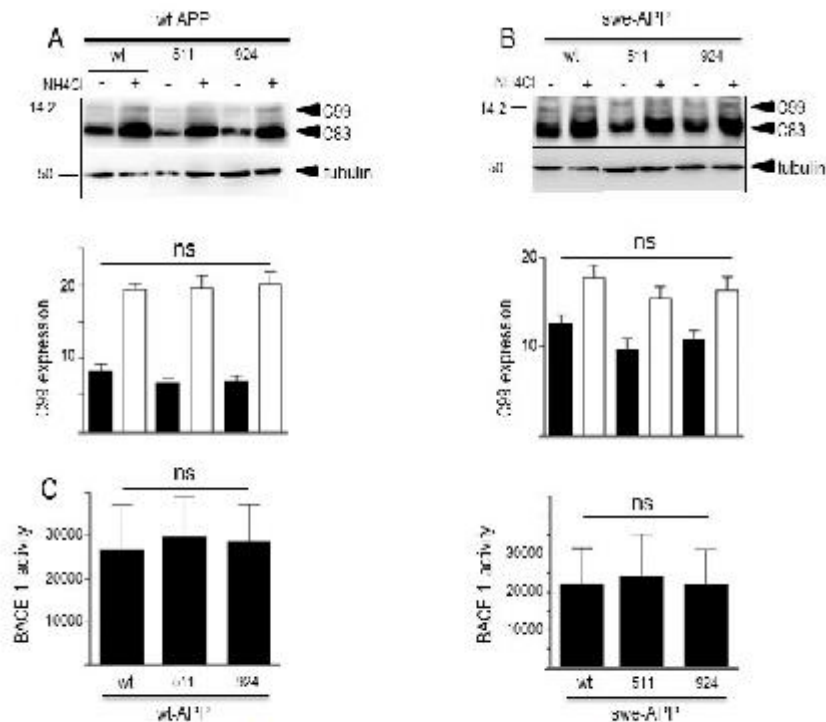


**Figure 6.** Influence of wild-type and mutated SorLA on  $\gamma$ -secretase expression and activity. cDNA encoding wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>S11</sup> or SorLA<sup>Q24</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP- (A, left panel) or swe-APP- (A, right panel) expressing HEK293 cells, in absence (–) or in the presence (+) of NH<sub>4</sub>Cl. Twenty-four hours after transfection, the expressions of presenilin 1 (PS1), presenilin 2 (PS2), Aph1, Pen2, nicastrin and tubulin were analyzed by Western blotting as described in the experimental procedure. In (B), in vitro  $\gamma$ -secretase activity was measured in reconstituted membranes prepared from cells expressing SorLA<sup>wt</sup> or SorLA mutants as described in the experimental procedures. Bars are densitometric analyses of A $\beta$  and AICD expressions and are the means  $\pm$  SEM of 6 independent experiments. All full gels are shown in Supplementary Materials.

### 3.3. Influence of Wild-Type SorLA and Its Mutants on APP C-Terminal Fragments and $\beta$ -Secretase Activity

The amyloidogenic pathway occurring on APP always consists of a rate-limiting catalytic step by the  $\beta$ -secretase BACE1 [40] that yields a C-terminal (CTF) fragment referred to as C99. C99 can undergo a  $\alpha$ -secretase-mediated hydrolysis generating another CTF called C83 [41–43]. Subsequently, both C99 and C83 produce the transcription factor AICD upon  $\gamma$ -secretase-mediated cleavage. We examined the putative influence of wt- and mutated SorLA on CTFs expressions in wt-expressing stably transfected cells. As expected, in the control condition, wt-APP increases the levels of both C83 and C99 (compare mock and DNA3 lanes in Supplementary Figure S3), but C83 expression was more abundant than C99 (Supplementary Figure S3C) in accordance with our previous observation that a significant part of C83 production was derived from C99 [41]. In these cells, wt- and mutated SorLA similarly reduce the expressions of C83 and C99 (Supplementary Figure S3C).

As expected, expressions of both CTFs were enhanced by the Swedish mutation (compare wt (–) lanes in Figure 7A,B) in agreement with previous reports on the influence of this APP mutation on  $\beta$ -secretase activity [44,45]. In both wt- and swe-APP-expressing cells, wt- and mutated SorLA similarly reduce the expressions of C83 and C99 (Figure 7A,B).



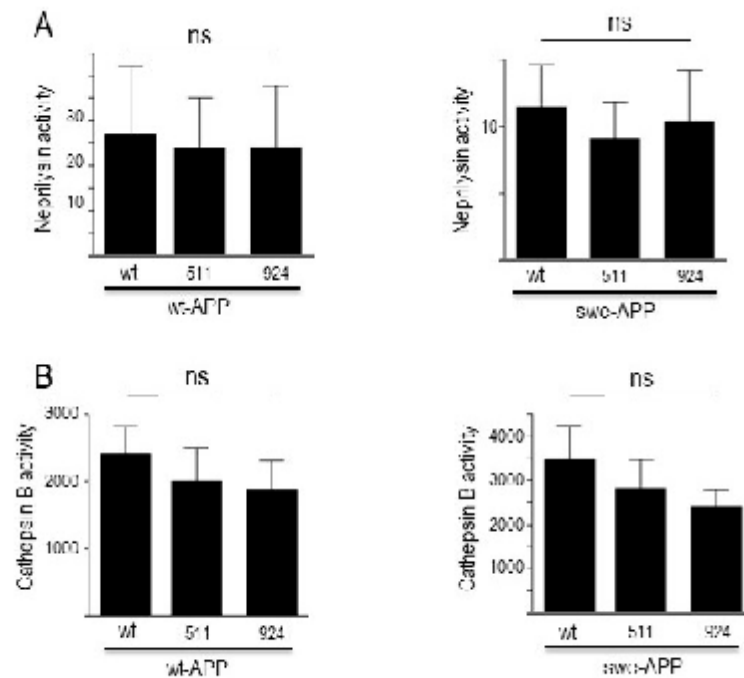
**Figure 7.** Influence of wild-type and mutated SorLA on CTFs expression and BACE1 activity. cDNA encoding wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>511</sup> or SorLA<sup>924</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP- (A) or swe-APP- (B) expressing HEK293 cells, in absence (–) or in the presence (+) of NH<sub>4</sub>Cl. Twenty-four hours after transfection, the expressions of CTFs (C83 and C99) and tubulin were analyzed by Western blotting as described in the experimental procedure. Bars are densitometric analyses of C99 expression and are the means ± SEM of 7 (A) or 6 (B) independent experiments. In (C), BACE1 activity was fluorimetrically measured in cell homogenates as described in the experimental procedures. Bars represent the  $\beta$ -secretase inhibitor I-sensitive (7-methoxycoumarin-4-yl) acetyl-SEVNL-DAEFR K (2,4-dinitrophenyl)-RRNH<sub>2</sub>-hydrolyzing activity and are the means ± SEM of 5 independent experiments. ns, non-statistically significant. All full gels are shown in Supplementary Materials.

A previous report also indicated that CTFs expression could be enhanced by alkalization [46], likely through a protection against proteolysis by acidic hydrolases [19,47]. This was clearly confirmed in Figure 7A,B where NH<sub>4</sub>Cl drastically enhanced both C99 and C83 expressions. This was apparently not due to a blockade of  $\gamma$ -secretase cleavage since NH<sub>4</sub>Cl did not affect  $\gamma$ -secretase components expressions in both cell lines, whatever the nature of SorLA examined (Figure 6A,B).

Both A $\beta$  (Figure 5) and C99 (Figure 7) productions that require BACE1-mediated APP cleavage are insensitive to SorLA mutations. This consistent set of data was further strengthened by direct monitoring of BACE1 activity by fluorimetric enzymatic assay [21]. Thus, we did not detect any modulation of BACE1 by wt- or mutated SorLA in both wt-APP- and swe-APP-expressing cells (Figure 7C).

### 3.4. Influence of Wild-Type SorLA and Its Mutants on Neprilysin and Cathepsin B Activities

In sporadic AD, A $\beta$  and CTF accumulation are not due to increased production but rather to age-related defects in their catabolic processes. Several enzymes are implicated in A $\beta$  degradation, but neprilysin appears consistently proposed as the main degrading enzyme [31,48,49]. Concerning C99 and C83, we and others have documented their destruction in lysosomal compartment by acidic hydrolases, including cathepsin B [19,47]. In this context, in order to complete our global view of both maturation and degradation processes, we assessed the putative influence of wt- and mutated SorLA on neprilysin and cathepsin B activities. Figure 8 illustrates the lack of influence of SorLA mutations on neprilysin (Figure 8A) and cathepsin B (Figure 8B), activities in both wt-APP- and swe-APP-expressing cells.



**Figure 8.** Influence of wild-type and mutated SorLA on neprilysin and cathepsin B activities. cDNA encoding wild-type (SorLA<sup>wt</sup>), SorLA<sup>S11</sup> or SorLA<sup>Q24</sup> cDNA were transiently transfected in wt-APP- or swe-APP-expressing HEK293 cells. Twenty-four hours after transfection, neprilysin (A) and cathepsin B (B) activities were fluorimetrically measured with either Suc-Ala-Ala-Phe-7AMC (in the absence or presence of the NEP inhibitor phosphoramidon) or with carboxybenzoyl-Arg-Arg-7-Amido-4-methylcoumarin (without or with leupeptin) for neprilysin and cathepsin B, respectively. Bars correspond to the inhibitor-sensitive hydrolyzing activities and are the means  $\pm$  SEM of 5 independent experiments. ns, non-statistically significant.

### 4. Discussion

Alzheimer's disease is a neurodegenerative pathology with complex etiology. A subset of cases with early onset and rapid progression are due to rare autosomal dominant mutations on APP and presenilins 1 and 2, while most of cases occur lately and are of sporadic origin. However, sporadic cases can be also influenced by a genetic component

since some appear linked to risk factors associated with mutations on a still growing number of genes.

The *SORL1* gene is the only gene to date that has been proposed to contribute to both EOAD and LOAD [8]. This gene encodes a protein SorLA, which binds to APP and promotes its retrieval in the Golgi complex and its retrograde transport from endosomes to the Golgi [16]. Further, SorLA is involved in the targeting of A $\beta$  peptides to the lysosomal compartment [15]. Overall, this suggested that *SORL1*-associated mutations could well contribute to AD pathology by modulating APP routing and proteolytic processing. However, close examination of data precluded to draw firm conclusions concerning the mechanisms that are defective in mutated SorLA-expressing cells or animal models. Particularly, there exist discrepancies between cellular and in vivo modulation of APP expression triggered by SorLA [15]. Further, functional consequences on APP processing and more precisely on A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 recoveries appeared highly variable according to the nature of the *SORL1* mutation and A $\beta$  species examined [16]. This led us to examine, in depth, the putative influence of *SORL1* mutations on the physiopathological maturation of APP as well as on the fate of various APP catabolites.

Because SorLA is involved in APP trafficking [50] and because APP routing is affected by the Swedish mutations, we first carried our study on cells expressing either wt- or swe-APP. In order to bring insights on expressions and fate of SorLA mutants, we assessed the influence of the proteasome inhibitor lactacystin [51]. This pharmacological treatment was previously shown to affect APP or secretases-related proteins [29]. We observed a potentiation of SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>924</sup> upon proteasome inhibition in both wt- and swe-APP-expressing cells.

SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>924</sup> expressions did not affect APP expression in both transiently or stably transfected cell models when compared to wt-SorLA. Our data envisioned the whole amount of APP because we considered that overall, this would reflect both intracellular and membrane-associated counterparts and thus, consists of a final readout of expression, traffic and clearance of APP. Our data agree with a previous study showing that *SORL1* mutants did not affect total APP expression in HEK293 cells [16]. However, it was of importance to confirm the cellular localization of wt-APP and SorLA. Our immunohistochemical analysis established first that wt-APP and wt-SorLA indeed co-localized in stably transfected CHO cells and, second, that the SorLA mutations moderately but significantly alter this co-localization.

Although wt-SorLA reduced the levels of secreted sAPP $\alpha$  in both transfectant models, we did not observe SorLA variants-associated modulation of sAPP $\alpha$ . Previous data concerning secreted  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretases-derived APP fragments led to contrasted observations. Thus, Vardarajan and coll. reported on an enhancement of sAPP $\beta$  by common and rare SorLA variants with no change linked to wt-SorLA [16]. Caglayan et al. showed that in vivo expression of wt-SorLA did not nor alter sAPP $\alpha$  levels [15]. Conversely, Cuccaro et al. showed a drastic reduction of sAPP $\alpha$  triggered by wt-SorLA and an increase observed after expression of two SorLA mutants linked to EOAD [13]. This could not be accounted for by distinct cell models as both studies were carried out on HEK293 cells expressing swe-APP. This emphasizes the fact that the influence on  $\alpha$ -secretase-mediated processing of APP could be differently affected by the nature of the SorLA mutations. In our study, to strengthen our observations, we directly measured  $\alpha$ -secretase activity on plated cells. We confirm that  $\alpha$ -secretase activity and C83 (the sAPP $\alpha$  C-terminal APP counterpart also referred to as  $\alpha$ -CTF) levels were not modulated by SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>924</sup> expressions.

Previous studies on the influence of SorLA mutants on A $\beta$  levels also led to contrasted conclusions. For instance, Cuccaro and colleagues reported on very faint increases of secreted A $\beta$ 42 triggered by two SorLA mutants to levels that remained lower or close to that recovered in mock-transfected cells [13]. Some of these mutants (SorLA T588I) even did not modify secreted levels of A $\beta$ 40. Whatever the mutant studied, sAPP $\beta$  levels remain similar to those recovered in mock-transfected swe-APP-expressing cells [13]. In another study, the level of secreted A $\beta$ 40 was affected by rare, but not by common, SorLA variants, while secreted A $\beta$ 42 was modulated by both variants [16]. These discrepant



data could be explained by the nature of the mutation examined, but also by the fact that A $\beta$  secreted represents only a subset of total A $\beta$  and that it is also important to assess the levels of intracellular A $\beta$ . Overall, our study indicates that wt-SorLA as well as SorLA<sup>511</sup> and SorLA<sup>924</sup> similarly reduced both intracellular and secreted A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 in both transiently and stably transfected cells. This conclusion was corroborated by three independent lines of results: (1)  $\beta$ -secretase activity was not modulated by SorLA variants; (2)  $\gamma$ -secretase activity and expressions of its four protein components were not changed upon SorLA variant expressions; (3) the expression of C99, which is the precursor of A $\beta$ , was not affected by SorLA mutations. It should be noted here that some of these data are supported by previous observations obtained with other variants. Thus, Vardarajan and colleagues did not observe any modulation of PSI (the catalytic core of  $\gamma$ -secretase) levels upon expressions of variants linked to both EOAD and LOAD [16].

Finally, we analyzed the putative influence of SorLA mutants on the events taking place downstream to APP catabolites production. A $\beta$  is mainly processed by neprilysin, while CTFs (C99 and C83) undergo proteolysis by acidic lysosomal proteases, including cathepsin B. As would be predictable from our above-described data, SorLA mutants did not modify these neprilysin and cathepsin B activities. Thus, neither production nor clearing mechanisms are affected by the SorLA mutations examined in our work.

## 5. Conclusions

Our study does not rule out the possibility that additional mutations could well influence APP physiopathological processing. However, we can conclude that our studied mutations reported to be linked to benign or severe AD cases do not trigger their putative pathogenic phenotype through modulation of APP physiopathological maturation. Again, this does not rule out the possibility that these mutations trigger pathogenic phenotypes by influencing other cellular pathways. Particularly, further study remains to be performed to assess the possible influence of these variants on Tau-related pathology or on hippocampal atrophy as has been described for a subset of *SORL1* mutants [52].

**Supplementary Materials:** The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/10.3390/cells12242802/s1>, Figure S1: Expression and fate of wt-SorLA and its mutants in stably transfected CHO cells; Figure S2: Immunohistochemical analysis of the co-localization of wt-APP and wt-SorLA of SorLA mutants in CHO stably transfected cells; Figure S3: APP, sAPP $\alpha$  and C-terminal fragments C83 and C99 expressions in stably transfected CHO cells expressing wt-APP and wt-SorLA of SorLA mutants; Figure S4: Secreted A $\beta$  peptides produced by stably transfected CHO cells expressing wt-APP and wt-SorLA of SorLA mutants.

**Author Contributions:** C.B. performed and analyzed the experiments, E.D. designed and characterized SORLA mutants, P.S.-G.-H. provided wild-type SORL1 cDNA and corrected the manuscript, F.C. designed the study, analyzed data and wrote the manuscript. 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).

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Data are contained within the article and supplementary materials.

**Acknowledgments:** We wish to acknowledge Dr. J.E.Hernandez (UMR5247 CNRS, Montpellier, France) for providing us with JMV2770. We would like to warmly thank the anonymous donor who contributed significantly with several gifts to our study.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- Bertram, L.; Tanzi, R.E. The genetics of Alzheimer's disease. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2012**, *107*, 79–100. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- St George-Hyslop, P.H.; Petit, A. Molecular biology and genetics of Alzheimer's disease. *C. R. Biol.* **2005**, *328*, 119–130. [[CrossRef](#)]
- Cacace, R.; Sleegers, K.; Van Broeckhoven, C. Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited. *Alzheimer's Dement. J. Alzheimer's Assoc.* **2016**, *12*, 733–748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pihlstrom, L.; Wiethoff, S.; Houlden, H. Genetics of neurodegenerative diseases: An overview. *Handb. Clin. Neurol.* **2017**, *145*, 309–323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Giri, M.; Zhang, M.; Lu, Y. Genes associated with Alzheimer's disease: An overview and current status. *Clin. Interv. Aging* **2016**, *11*, 665–681. [[CrossRef](#)]
- Lambert, J.C.; Amouyel, P. Genetics of Alzheimer's disease: New evidences for an old hypothesis? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **2011**, *21*, 295–301. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- 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](#)]
- Rogaeva, E.; Meng, Y.; Lee, J.H.; Gu, Y.; Kawarai, Y.; Zou, F.; Katayama, T.; Baldwin, C.T.; Cheng, R.; Hasegawa, H.; et al. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease. *Nat. Genet.* **2007**, *39*, 168–177. [[CrossRef](#)]
- Jin, C.; Liu, X.; Zhang, F.; Wu, Y.; Yuan, J.; Zhu, J.; Zhang, F.; Wang, G.; Cheng, Z. An updated meta-analysis of the association between SORL1 variants and the risk for sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* **2013**, *37*, 429–437. [[CrossRef](#)]
- Reitz, C.; Cheng, R.; Rogaeva, E.; Lee, J.H.; Tokuhiro, S.; Zou, F.; Bettens, K.; Sleegers, K.; Tan, E.K.; Kimura, R.; et al. Meta-analysis of the association between variants in SORL1 and Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* **2011**, *68*, 99–106. [[CrossRef](#)]
- Wang, Z.; Lei, H.; Zheng, M.; Li, Y.; Cui, Y.; Hao, F. Meta-analysis of the Association between Alzheimer Disease and Variants in GAB2, PICALM, and SORL1. *Mol. Neurobiol.* **2016**, *53*, 6501–6510. [[CrossRef](#)]
- Pottier, C.; Hannequin, D.; Coutant, S.; Rovelet-Lecrux, A.; Wallon, D.; Rousseau, S.; Legallec, S.; Paquet, C.; Bombois, S.; Pariente, J.; et al. High frequency of potentially pathogenic SORL1 mutations in autosomal dominant early-onset Alzheimer disease. *Mol. Psychiatry* **2012**, *17*, 875–879. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Cuccaro, M.L.; Carney, R.M.; Zhang, Y.; Bohm, C.; Kunkle, B.W.; Vardarajan, B.N.; Whitehead, P.L.; Cukier, H.N.; Mayeux, R.; St George-Hyslop, P.; et al. SORL1 mutations in early- and late-onset Alzheimer disease. *Neural Genet.* **2016**, *2*, e116. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Selkoe, D.J. Normal and abnormal biology of the  $\beta$ -amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* **1994**, *17*, 489–517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Caglayan, S.; Takagi-Niidome, S.; Liao, F.; Carlo, A.S.; Schmidt, V.; Burgert, T.; Kitago, Y.; Fuchtbauer, E.M.; Fuchtbauer, A.; Holtzman, D.M.; et al. Lysosomal Sorting of Amyloid- $\beta$  by the SORLA Receptor Is Impaired by a Familial Alzheimer's Disease Mutation. *Sci. Transl. Med.* **2014**, *6*, 223ra220. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Vardarajan, B.N.; Zhang, Y.; Lee, J.H.; Cheng, R.; Bohm, C.; Ghani, M.; Reitz, C.; Reyes-Dumeyer, D.; Shen, Y.; Rogaeva, E.; et al. Coding mutations in SORL1 and Alzheimer disease. *Ann. Neurol.* **2015**, *77*, 215–227. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Guillot-Sestier, M.V.; Sunyach, C.; Ferreira, S.T.; Marzolo, M.P.; Bauer, C.; Thevenet, A.; Checler, F.  $\alpha$ -Secretase-derived fragment of cellular prion, N1, protects against monomeric and oligomeric amyloid  $\beta$  (A $\beta$ )-associated cell death. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 5021–5032. [[CrossRef](#)]
- Chami, L.; Buggia-Prevot, V.; Duplan, E.; Delprete, D.; Chami, M.; Peyron, J.F.; Checler, F. Nuclear factor- $\kappa$ B regulates  $\beta$ APP and  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases differently at physiological and supraphysiological A $\beta$  concentrations. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 24573–24584. [[CrossRef](#)]
- 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  $\beta$ -secretase-derived C-terminal fragment of  $\beta$ APP, C99, but not A $\beta$ , is a key contributor to early intraneuronal lesions in triple-transgenic mouse hippocampus. *J. Neurosci.* **2012**, *32*, 16243–16255. [[CrossRef](#)]
- Sevalle, J.; Amouyel, A.; Robert, P.; Fournie-Zaluski, M.C.; Roques, B.; Checler, F. Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid  $\beta$ -peptide. *J. Neurochem.* **2009**, *109*, 248–256. [[CrossRef](#)]
- Andrau, D.; Dumanchin-Njock, C.; Ayrat, 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](#)] [[PubMed](#)]
- Cisse, M.A.; Gandreuil, C.; Hernandez, J.F.; Martinez, J.; Checler, F.; Vincent, B. Design and characterization of a novel cellular prion-derived quenched fluorimetric substrate of  $\alpha$ -secretase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2006**, *347*, 254–260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Bradford, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 248–259. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Pardossi-Piquard, R.; Petit, A.; Kawarai, Y.; Sunyach, C.; Alves da Costa, C.; Vincent, B.; Ring, S.; D'Adamio, L.; Shen, J.; Muller, U.; et al. Presenilin-dependent transcriptional control of the A $\beta$ -degrading enzyme neprilysin by intracellular domains of  $\beta$ APP and APLP. *Neuron* **2005**, *46*, 541–554. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

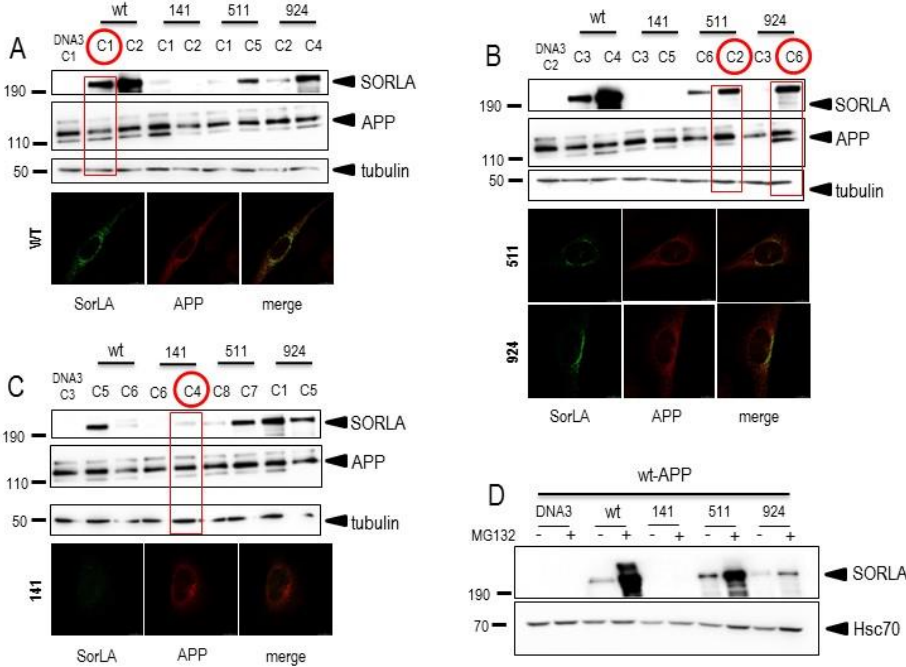
25. Andersen, O.M.; Reiche, J.; Schmidt, V.; Gotthardt, M.; Spoelgen, R.; Behlke, J.; von Arnim, C.A.; Breiderhoff, T.; Jansen, P.; Wu, X.; et al. Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 13461–13466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Haass, C.; Lemere, C.A.; Capell, A.; Citron, M.; Seubert, P.; Schenk, D.; Lannfelt, L.; Selkoe, D. The Swedish mutation causes early-onset Alzheimer's disease by  $\beta$ -secretase cleavage within the secretory pathway. *Nat. Med.* **1995**, *1*, 1291–1296. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Fenteany, G.; Schreiber, S.L. Lactacystin, proteasome function, and cell fate. *J. Biol. Chem.* **1998**, *273*, 8545–8548. [[CrossRef](#)]
28. Marambaud, P.; Ancolio, K.; Lopez-Perez, E.; Checler, F. Proteasome inhibitors prevent the degradation of familial Alzheimer's disease-linked presenilin 1 and potentiate A $\beta$ 42 recovery from human cells. *Mol. Med.* **1998**, *4*, 147–157. [[CrossRef](#)]
29. Durnys, J.; Kawarai, T.; Giaime, E.; Wilk, S.; Herrant, M.; Auberger, P.; St George-Hyslop, P.; Alves da Costa, C.; Checler, F. Study on the putative contribution of caspases and the proteasome to the degradation of Aph-1a and Pen-2. *Neurodegener. Dis.* **2007**, *4*, 156–163. [[CrossRef](#)]
30. Carson, J.A.; Turner, A.J.  $\beta$ -Amyloid catabolism: Roles for neprilysin (NEP) and other metallopeptidases? *J. Neurochem.* **2002**, *81*, 1–8. [[CrossRef](#)]
31. Mirers, J.S.; Baig, S.; Palmer, J.; Palmer, L.E.; Kehoe, P.G.; Love, S. SYMPOSIUM: Clearance of A $\beta$  from the Brain in Alzheimer's Disease: A $\beta$ -degrading enzymes in Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* **2008**, *18*, 240–252. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Shirogami, K.; Tsubuki, S.; Iwata, N.; Takaki, Y.; Harigaya, W.; Maruyama, K.; Kiryu-Seo, S.; Kiyama, H.; Iwata, H.; Tomita, T.; et al. Neprilysin degrades both amyloid  $\beta$  peptides 1–40 and 1–42 most rapidly and efficiently among thiorphan- and phosphoramidon-sensitive endopeptidases. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 21895–21901. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Kuperstein, I.; Broersen, K.; Benilova, I.; Rozanski, J.; Jonckheere, W.; Debulpaep, M.; Vandersteern, A.; Segers-Nolten, I.; Van Der Werf, K.; Subramaniam, V.; et al. Neurotoxicity of Alzheimer's disease A $\beta$  peptides is induced by small changes in the A $\beta$ 42 to A $\beta$ 40 ratio. *EMBO J.* **2010**, *29*, 3408–3420. [[CrossRef](#)]
34. Chui, D.H.; Dobo, E.; Makifuchi, T.; Akiyama, H.; Kawakatsu, S.; Petit, A.; Checler, F.; Araki, W.; Takahashi, K.; Yabira, T. Apoptotic neurons in Alzheimer's disease frequently show intracellular A $\beta$ 42 labeling. *J. Alzheimer's Dis.* **2001**, *3*, 231–239. [[CrossRef](#)]
35. Takasugi, N.; Tomita, T.; Hayashi, I.; Tsuruoka, M.; Niimura, M.; Takahashi, Y.; Thinakaran, G.; Iwatsubo, T. The role of presenilin cofactors in the  $\gamma$ -secretase complex. *Nature* **2003**, *422*, 438–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Haass, C. Take five—BACE and the  $\gamma$ -secretase quartet conduct Alzheimer's amyloid  $\beta$ -peptide generation. *EMBO J.* **2004**, *23*, 483–488. [[CrossRef](#)]
37. De Strooper, B. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active  $\gamma$ -secretase complex. *Neuron* **2003**, *38*, 9–12. [[CrossRef](#)]
38. De Strooper, B.; Saftig, P.; Craessaerts, K.; Vanderstichele, H.; Guhde, G.; Annaert, W.; Von Figura, K.; Van Leuven, F. Deficiency of presenilin-1 inhibits the normal cleavage of amyloid precursor protein. *Nature* **1998**, *391*, 387–390. [[CrossRef](#)]
39. Wolfe, M.S.; Xia, W.; Ostaszewski, B.L.; Diehl, T.S.; Kimberly, W.T.; Selkoe, D.J. Two transmembrane aspartates in presenilin-1 required for presenilin endoproteolysis and  $\gamma$ -secretase activity. *Nature* **1999**, *398*, 513–517. [[CrossRef](#)]
40. Cole, S.L.; Vassar, R. The Alzheimer's disease  $\beta$ -secretase enzyme, BACE1. *Mol. Neurodegener.* **2007**, *2*, 22. [[CrossRef](#)]
41. 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. Alzheimer's Dis.* **2012**, *30*, 145–153. [[CrossRef](#)]
42. Goodger, Z.V.; Rajendran, L.; Trutzel, A.; Kohli, B.M.; Nitsch, R.M.; Konietzko, U. Nuclear signaling by the APP intracellular domain occurs predominantly through the amyloidogenic processing pathway. *J. Cell Sci.* **2009**, *122*, 3703–3714. [[CrossRef](#)]
43. Belyaev, N.D.; Kellett, K.A.; Beckett, C.; Makova, N.Z.; Revett, T.J.; Nalivaeva, N.N.; Hooper, N.M.; Turner, A.J. The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a  $\beta$ -Secretase-dependent Pathway. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 41443–41454. [[CrossRef](#)]
44. Citron, M.; Oltersdorf, T.; Haass, C.; McConlogue, L.; Hung, A.Y.; Seubert, P.; Vigo-Pelfrey, C.; Lieberburg, I.; Selkoe, D.J. Mutation of the  $\beta$ -amyloid precursor protein in familial Alzheimer's disease increases  $\beta$ -protein production. *Nature* **1992**, *360*, 672–674. [[CrossRef](#)]
45. Perez, R.G.; Squazzo, S.L.; Koo, E.H. Enhanced release of amyloid  $\beta$ -protein from codon 670/671 "Swedish" mutant  $\beta$ -amyloid precursor protein occurs in both secretory and endocytic pathways. *J. Biol. Chem.* **1996**, *271*, 9100–9107. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Vingtdoux, V.; Hamdane, M.; Loyens, A.; Gele, P.; Drobeck, H.; Begard, S.; Galas, M.C.; Delacourte, A.; Beauvillain, J.C.; Buee, L.; et al. Alkalinizing drugs induce accumulation of amyloid precursor protein by-products in luminal vesicles of multivesicular bodies. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 18197–18205. [[CrossRef](#)]
47. Lauritzen, I.; Pardossi-Piquard, R.; Bourgeois, A.; Pagnotta, S.; Biferi, M.G.; Barkats, M.; Lacoq, P.; Klein, W.; Bauer, C.; Checler, F. Intraneuronal aggregation of the  $\beta$ -CTF fragment of APP (C99) induces A $\beta$ -independent lysosomal-autophagic pathology. *Acta Neuropathol.* **2016**, *132*, 257–276. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Nalivaeva, N.N.; Fisk, L.R.; Belyaev, N.D.; Turner, A.J. Amyloid-degrading enzymes as therapeutic targets in Alzheimer's disease. *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 212–224. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. Hersh, L.B.; Rodgers, D.W. Neprilysin and amyloid beta peptide degradation. *Curr. Alzheimer Res.* **2008**, *5*, 225–231. [[CrossRef](#)]



50. Jacobsen, L.; Madsen, P.; Jacobsen, C.; Nielsen, M.S.; Gliemann, J.; Petersen, C.M. Activation and functional characterization of the mosaic receptor SorLA/LR11. *J. Biol. Chem.* **2001**, *276*, 22788–22796. [[CrossRef](#)]
51. Fenteany, G.; Staendert, R.; Lane, W.S.; Choi, S.; Corey, E.J.; Schreiber, S.L. Inhibition of proteasome activities and subunit-specific amino-terminal threonine modification by lactacystin. *Science* **1995**, *268*, 726–731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Louwersheimer, E.; Ramirez, A.; Cruchaga, C.; Becker, T.; Kornhuber, J.; Peters, O.; Heilmann, S.; Wiltfang, J.; Jessen, F.; Visser, P.J.; et al. The influence of genetic variants in *SORLI* gene on the manifestation of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* **2015**, *36*, 1605.e13–1605.e20. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

**Disclaimer/Publisher's Note:** The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

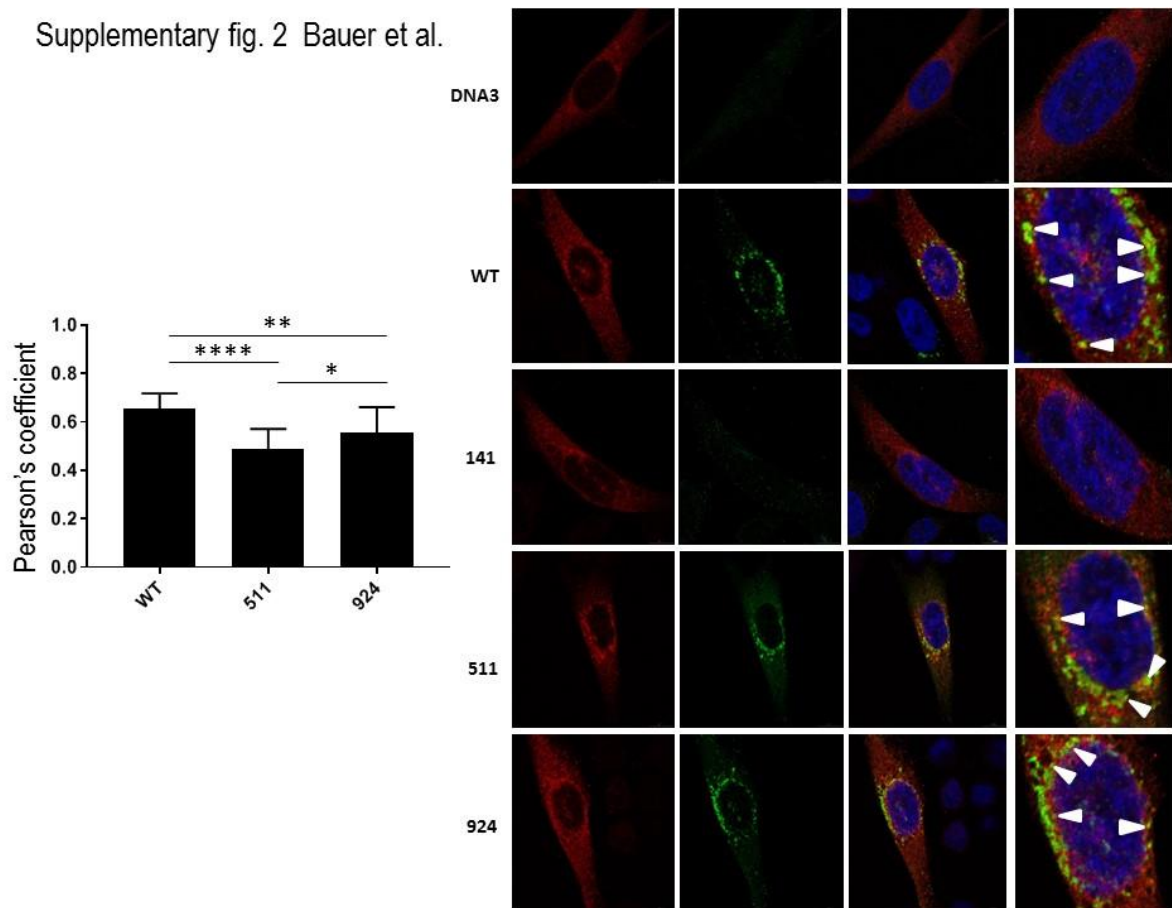
# Supplementary Figures



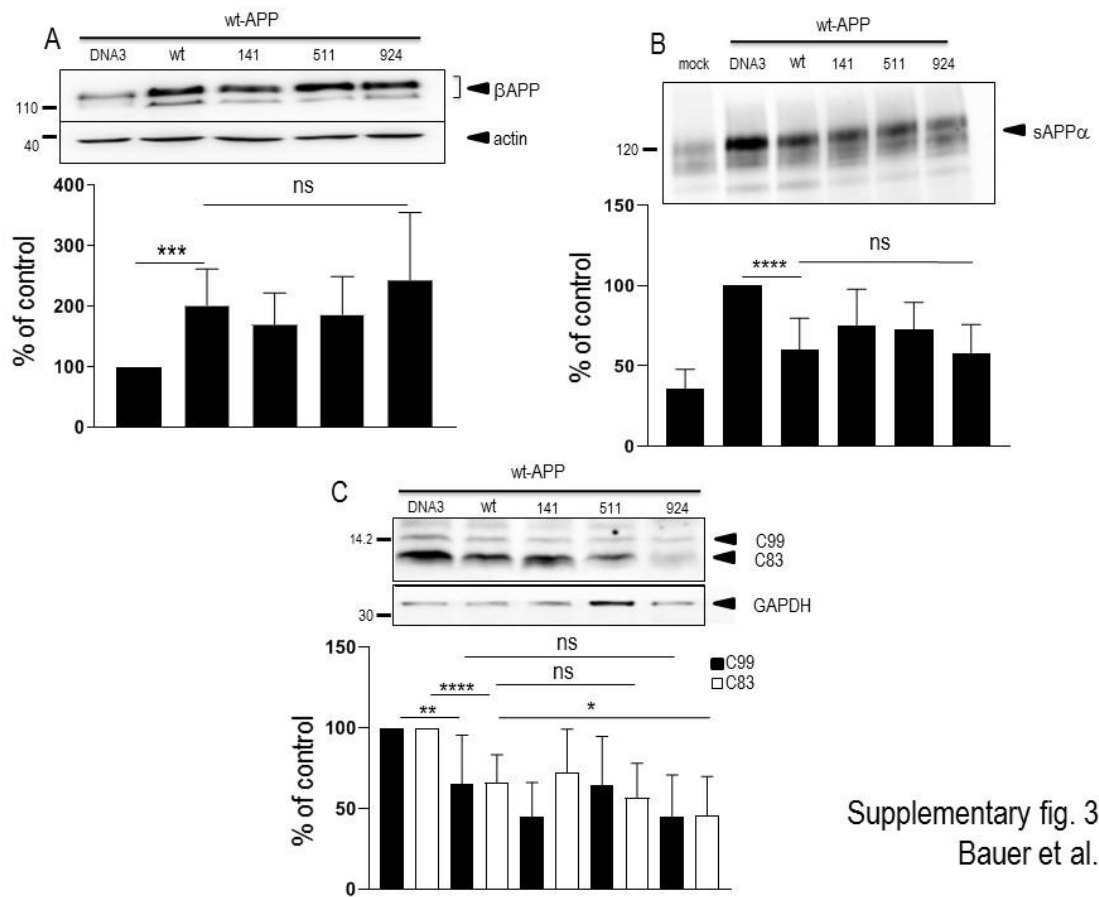
Supplementary fig. 1 Bauer et al.

Supplementary Figure 1. Expression and fate of wt-SorLA and its mutants in stably transfected CHO cells

Supplementary fig. 2 Bauer et al.

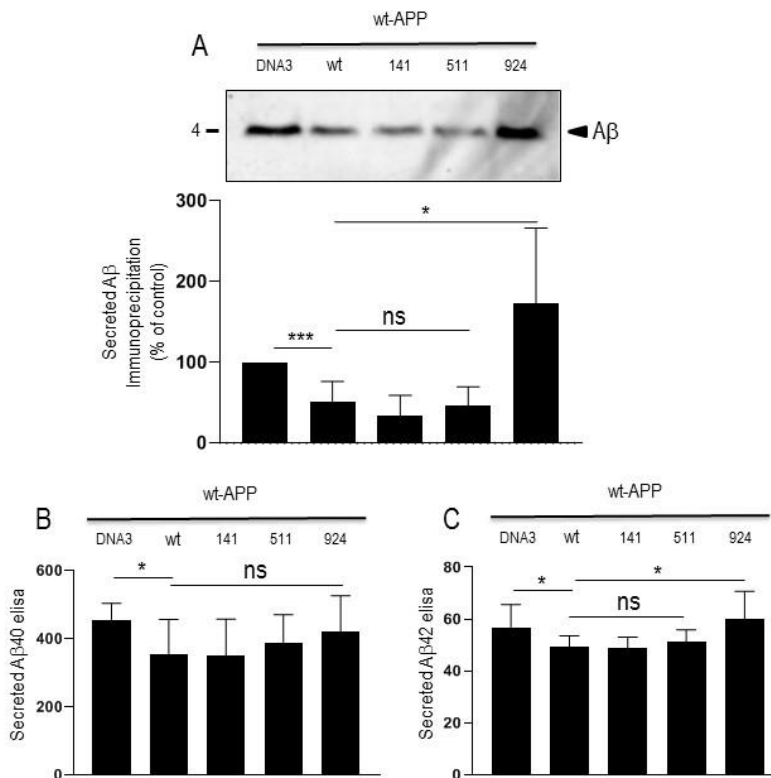


**Supplementary Figure 2.** Immunohistochemical analysis of the co-localization of wt-APP and wt-SorLA of SorLA mutants in CHO stably transfected cells



Supplementary fig. 3  
Bauer et al.

**Supplementary Figure 3.**  $\beta$ APP, sAPP $\alpha$  and C-terminal fragments C83 and C99 expressions in stably transfected CHO cells expressing wt-APP and wt-SorLA of SorLA mutants



Supplementary fig. 4 Bauer et al.

**Supplementary Figure 4.** Secreted A $\beta$  peptides produced by stably transfected CHO cells expressing wt-APP and wt-SorLA of SorLA mutants

## C-Objectif 2 :

La tyrosine kinase Pyk2 a été identifiée dans de multiples études GWAS comme un facteur de risque de la MA tardive (Jean-Charles Lambert et al. 2013) (E. Lin et al. 2017) et au moins un variant de gène *PTK2B* est associé à la MA (rs28834970) (Chan et al. 2015). En l'absence de stimulus, la protéine Pyk2, majoritairement cytoplasmique, a une conformation fermée non active, mais lorsque la concentration intracellulaire en calcium  $Ca^{2+}$  augmente, elle se dimérise entraînant l'auto-phosphorylation de son site Y402 qui la rend active. Elle s'accumule dans le noyau où elle interagirait avec p53. Mon laboratoire ayant l'expertise de l'étude du métabolisme de  $\beta$ APP et du suppresseur de tumeur p53, nous avons étudié l'effet de la mutation Y402F, générée par mutagenèse dirigée (Figure 28), abolissant l'activité kinase de Pyk2, sur ces 2 paradigmes.



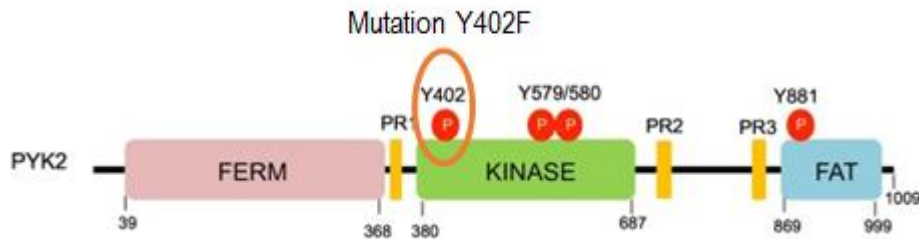


Figure 28 : La localisation de la mutation Y402F sur la protéine Pyk2 (d'après Gil-Henn, Girault, et Lev 2023)

## D-Résultats 2 :

Résultats préliminaires : Contribution à l'étude des facteurs de risque pour la maladie d'Alzheimer : analyse du candidat *PTK2B* identifié par étude d'association pangénomique ou GWAS

a- Matériels et Méthodes :

1- Constructions et mutagenèse dirigée :

L'ADNc (ADN complémentaire) de *PTK2B* sauvage a été commandé chez Addgene (Teddington, UK). À l'aide du kit Quickchange II (Stratagene, Californie) et des amorces (Eurogentec, Belgique) sens 5'-TAGAGTCAGACATCTTCGCAGAGATTCCCG-3' et antisens 5'-CGTAGTAACTTCTCCTCGGGTGG-3', nous avons généré le mutant Y402F par substitution d'une tyrosine par une phénylalanine. Cette mutation abolit l'activité kinase de Pyk2. Elle a été validée par séquençage.

2- Culture cellulaire et transfection :

Les cellules HEK-293 et SH-SY5Y naïves ou exprimant  $\beta$ APP sauvage (APP-WT) ou  $\beta$ APP portant la double mutation suédoise APP<sub>670/671</sub> (APP-SWE) sont cultivées dans le milieu DMEM (Invitrogen) + 10% SVF (sérum de veau fœtal, Sigma) + antibiotiques (50U/ml pénicilline – 50 $\mu$ g/ml streptomycine, Invitrogen), 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Quand les cellules ont atteint 80% de confluence, le vecteur vide pcDNA3 ou l'ADNc de *PTK2B* sauvage ou muté est transitoirement transfecté (24h) en utilisant le

réactif jetPRIME (Polyplus) (2 $\mu$ g d'ADNc pour un diamètre 35 mm (plaque 6 puits) ou 10 $\mu$ g d'ADNc pour un diamètre 100 mm).

Les cellules MEF (pour Mouse Embryonic Fibroblast) A- (Arf $^{-/-}$ ) ou AP- (Arf $^{-/-}$  ; p53 $^{-/-}$ ) (Kamijo et al. 1997) sont cultivées dans le milieu DMEM (Invitrogen) + 10% SVF (Sérum de Veau Fœtal, Sigma) + antibiotiques (50U/ml pénicilline – 50 $\mu$ g/ml streptomycine, Invitrogen), 5% CO<sub>2</sub>, 37°C. Pour observer les effets du PF-431396 (inhibiteur non spécifique de l'autophosphorylation du Pyk2), les cellules sont traitées en dose réponse (0, 1, 5, 10 et 20  $\mu$ M), 16h, 37°C.

### 3- Immunoempreinte :

Pyk2,  $\beta$ APP, sAPP $\alpha$ , les fragments C-ter CTF, p53 et l'actine sont séparés sur gels de polyacrylamide Tris/Glycine (8 à 10%) ou gels Tris/Tricine (16.5%). Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C (GE Healthcare) puis incubées avec les anticorps primaires suivants : anti-Pyk2 (Sigma-Aldrich), anti-Cter de  $\beta$ APP (Sigma-Aldrich), W02 (anti-A $\beta$ , épitope sur résidus 1-12 d'A $\beta$  humain, Sigma-Alrich), anti-p53 (fourni par le Dr. J.-C. Bourdon, Scotland, UK) et anti-actine (Sigma-Aldrich). Les complexes immunologiques sont révélés avec les anticorps secondaires anti-souris ou lapin couplés à la peroxydase (Interchim) puis par chimioluminescence.

### 4- Activité transcriptionnelle de p53 :

L'activité de p53 est mesurée à l'aide d'un test biologique par transfection transitoire de l'ADNc de la PG13-luciférase (fourni par le Dr. B. Vogelstein, Baltimore, MD), qui est basé sur la séquence consensus de l'ADN génomique reconnue par p53 sur ses gènes cibles (El-Deiry et al. 1992). Les cellules MEF A- ou AP- ont été cultivées dans des plaques 12 puits jusqu'à ce qu'elles atteignent 70 % de confluence, puis cotransfectées avec 1,5  $\mu$ g d'ADNc de la PG13-luciférase + 0,5  $\mu$ g de vecteur de transfection de la  $\beta$ -galactosidase (pour normaliser la transfection) + 1  $\mu$ g de vecteur vide pcDNA3 ou d'ADNc *PTK2B* sauvage ou muté à l'aide du réactif de transfection Lipofectamine 2000 selon les conditions du fabricant (Invitrogen). 24h après la transfection, les activités luciférase et galactosidase sont analysées selon les conditions du fabricant (kit Promega).

### 5- Analyses statistiques :

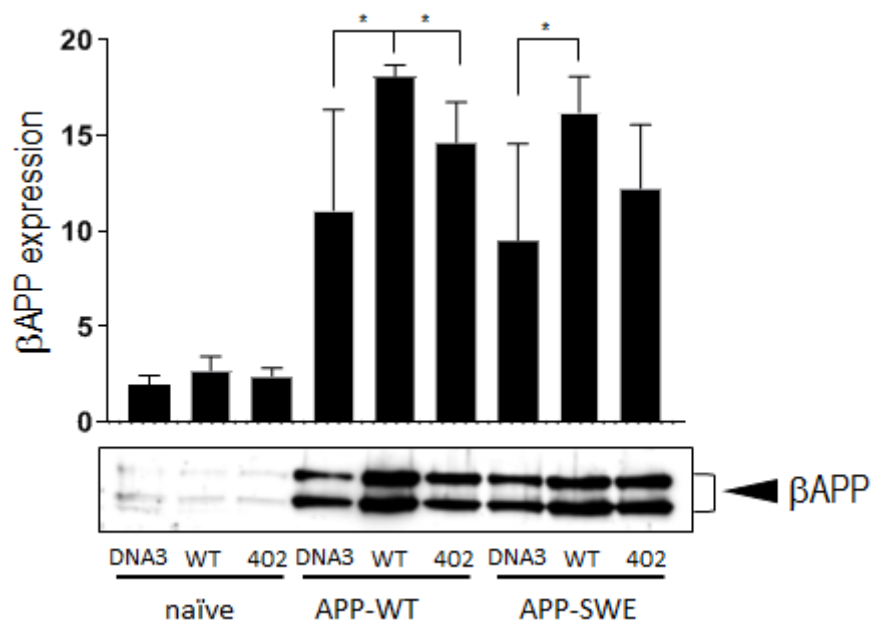
Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel PRISM (logiciel Graph-Pad, San Diego) en utilisant le test t de Student non apparié pour les comparaisons par paires avec application de la distribution Gaussienne pour utiliser un test paramétrique.

b- Résultats :

1- Effets de l'abolition de l'activité kinase de Pyk2 sur le métabolisme de  $\beta$ APP dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y :

Après avoir obtenu la mutation Y402F de Pyk2, sur son site d'autophosphorylation et abolissant son activité kinase, nous avons examiné son effet sur le métabolisme de  $\beta$ APP. Pour ce faire, nous avons utilisé 3 constructions distinctes, les vecteurs codant pour pcDNA3 vide, Pyk2 sauvage (WT) et Pyk2 mutée (Y402F) dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y naïves, APP-WT et APP-SWE. Nous avons mesuré l'expression de  $\beta$ APP, la sécrétion du fragment sAPP $\alpha$  et l'expression des fragments C-ter C99 et C83.

Dans les cellules HEK-293 APP-WT et APP-SWE, on constate une augmentation de l'expression de  $\beta$ APP quand on surexprime Pyk2 WT. Cet effet réduit par Pyk2 mutée (*Figure 29*).



*Figure 29 : expression de  $\beta$ APP dans les cellules HEK-293 transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> ou Pyk2<sup>Y402F</sup>*

Les résultats sont identiques pour la sécrétion de sAPP $\alpha$  (*Figure 30*). Dans les cellules naïves, sAPP $\alpha$  n'est pas détectable.

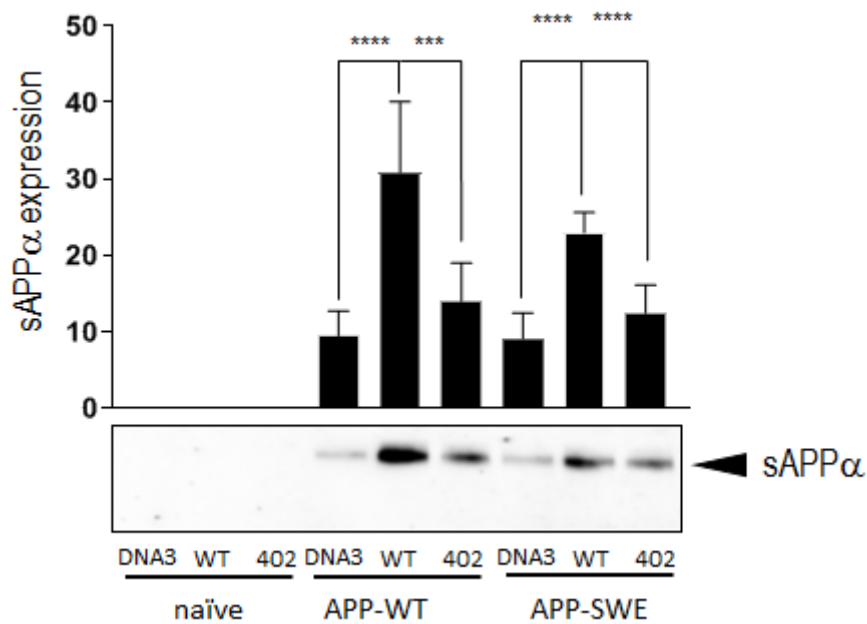


Figure 30 : sécrétion de sAPP $\alpha$  dans les cellules HEK-293 transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> ou Pyk2<sup>Y402F</sup>

En ce qui concerne l'expression des CTF C99 et C83, dans les HEK-293 APP-WT et APP-SWE, seule l'expression de C83 est affectée puisque son expression est augmentée par la surexpression de Pyk2 WT mais pas par Pyk2 (Y402F) (Figure 29). Ces expériences préliminaires semblent indiquer une augmentation de C83 par Pyk2 WT mais sans effet de la mutation (Figure 31).

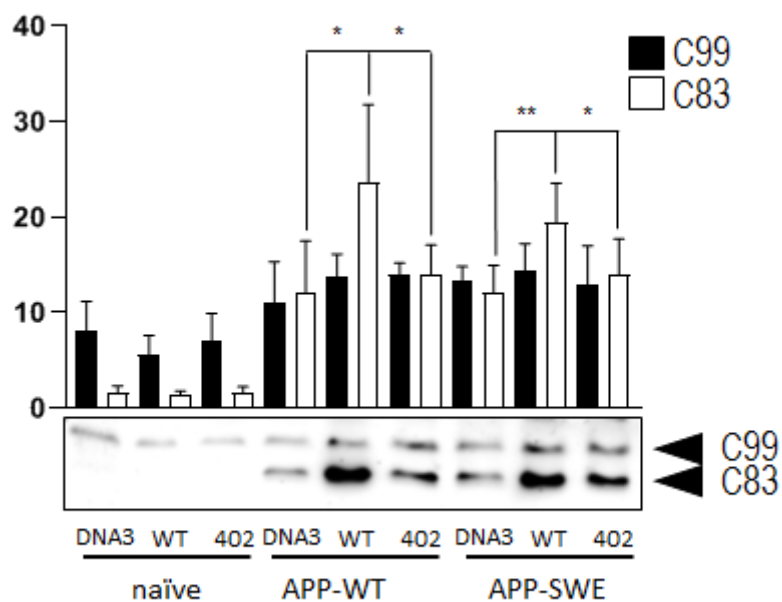


Figure 31 : expression de C99 et C83 dans les cellules HEK-293 transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> ou Pyk2<sup>Y402F</sup>

En revanche, dans les cellules SH-SY5Y, les expériences d'expression de  $\beta$ APP et de sécrétion de sAPP $\alpha$ , suite à l'expression des mêmes constructions pcDNA3, Pyk2 WT et Pyk2 mutée (Y402F), ont également été réalisées. Dans ces expériences, ni les niveaux de  $\beta$ APP, ni les niveaux de sAPP $\alpha$  ne sont affectés par Pyk2 WT et mutée (Figure 32 et 33). Ceci pourrait indiquer une spécificité cellulaire des paradigmes étudiés dans les HEK-293 et les SH-SY5Y.

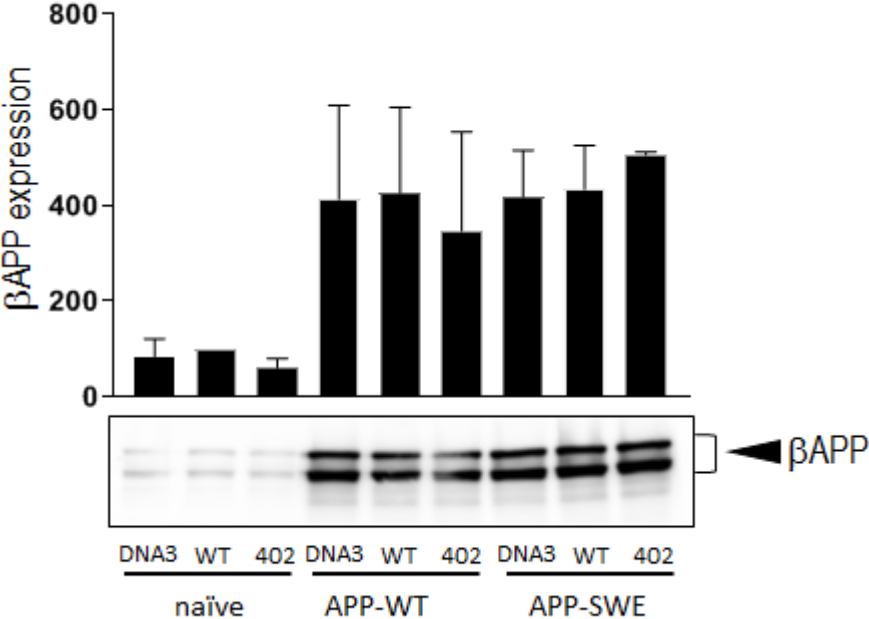


Figure 32 : expression de  $\beta$ APP dans les cellules SH-SY5Y transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> ou Pyk2<sup>Y402F</sup>

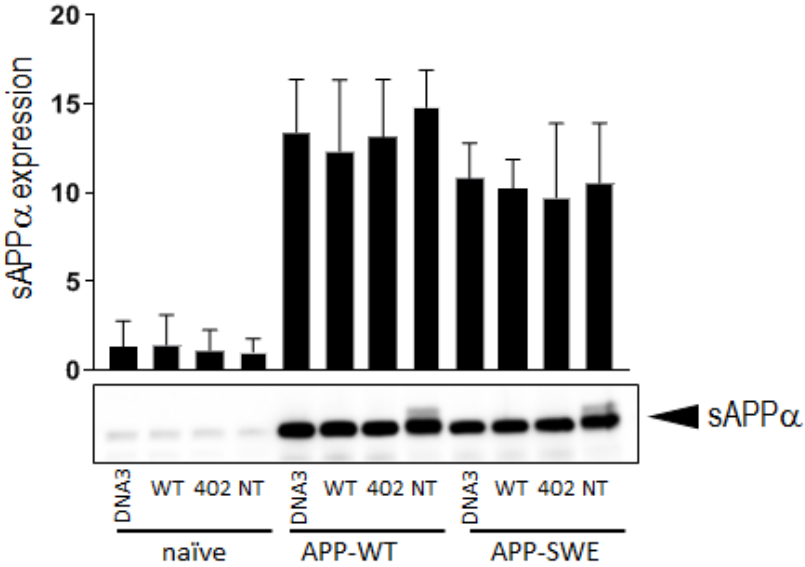


Figure 33 : sécrétion de sAPP $\alpha$  dans les cellules SH-SY5Y transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> ou Pyk2<sup>Y402F</sup>

Ces résultats dans les cellules SH-SY5Y sont bien évidemment décevants par rapport à ceux observés dans les HEK-293. Le modèle SH, une lignée cellulaire humaine de neuroblastome issue de la moelle osseuse, se rapproche plus de la pathologie Alzheimer par rapport aux HEK-293, une lignée cellulaire issue de rein embryonnaire humain. Cependant les SH-SY5Y ont leur limite. Elles correspondent à des neuroblastes, c'est-à-dire des cellules nerveuses embryonnaires qui ne sont pas différenciées. Il serait certainement intéressant de reproduire ces expériences dans des SH-SY5Y différenciées ou dans des cultures primaires de neurones de souris par exemple. Ces résultats doivent bien évidemment être reproduits et d'autres acteurs de ce métabolisme doivent être étudiés. Il serait aussi intéressant d'examiner le rôle inhibiteur de Pyk2 sur la maturation physiopathologique de la  $\beta$ APP dans les HEK-293 comme cela a été réalisé pour p53 (voir ci-dessous).

## 2- Dialogue fonctionnel entre Pyk2 et p53 :

Dans un premier temps, nous avons étudié l'effet de p53 sur Pyk2 WT endogène. Dans les cellules MEF invalidées p53 (AP-), nous observons une baisse de l'expression de Pyk2 (Figure 34) par rapport à leur contrôle (A-).

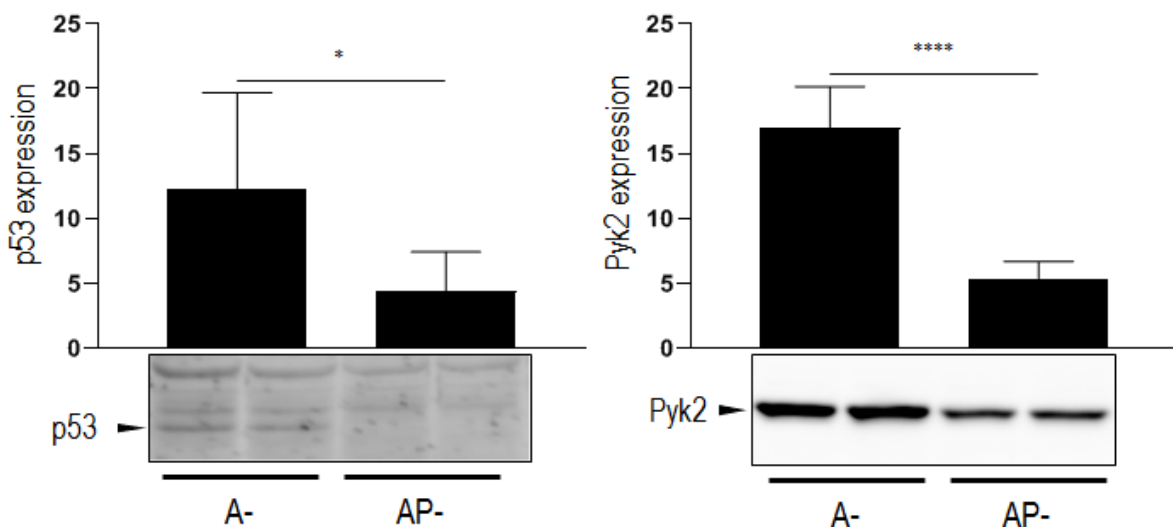
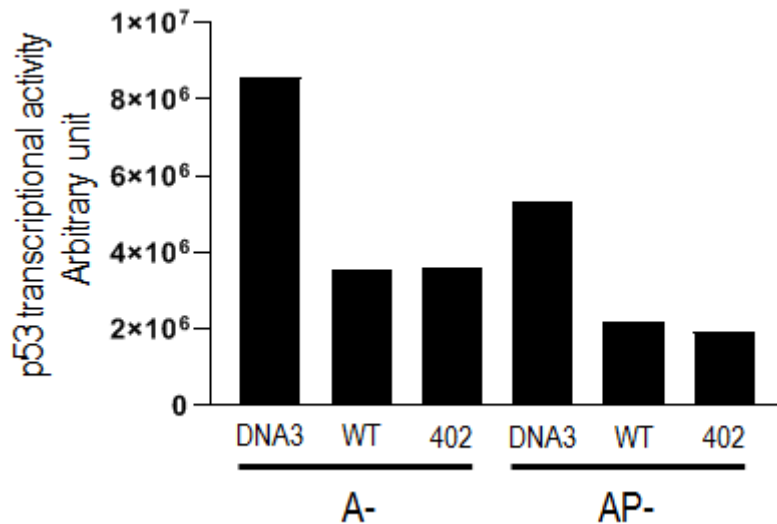


Figure 34 : expression de p53 et Pyk2 dans les cellules MEF Arf<sup>-/-</sup> et MEF Arf<sup>-/-</sup> ; p53<sup>-/-</sup>

Nous avons ensuite étudié l'effet de Pyk2 sur p53. Dans les MEF A- et AP-, nous avons transfecté l'ADNc du vecteur vide pcDNA3, Pyk2 WT ou mutée (Y402F). Nous avons alors mesuré l'activité transcriptionnelle de p53 à l'aide de la construction PG13-luciférase qui est le rapporteur de l'activité transcriptionnelle de p53. On observe tout d'abord que l'activité transcriptionnelle de p53 est réduite mais pas abolie dans les cellules AP-. En effet, p53 fait partie d'une famille de protéines, incluant p63 et p73, présentant de fortes ressemblances structurales, qui pourraient

potentiellement reconnaître la séquence consensus de la PG13-luciférase. Les surexpressions de Pyk2 WT et mutée réduisent, de manière similaire, l'activité transcriptionnelle de p53 par rapport au vecteur vide dans les 2 types cellulaires (*Figure 35*).



*Figure 35 : activité transcriptionnelle de p53 dans les MEF Arf<sup>-/-</sup> et MEF Arf<sup>-/-</sup> ; p53<sup>-/-</sup> transfectées transitoirement pcDNA3, Pyk2<sup>WT</sup> ou Pyk2<sup>Y402F</sup>*

Il semblerait donc qu'il existe un dialogue fonctionnel entre Pyk2 et p53. En effet, en l'absence de p53, l'expression de Pyk2 est réduite et lors de la surexpression de Pyk2 (WT ou mutée), l'activité transcriptionnelle de p53 est baissée. Il existerait donc une boucle de rétro contrôle entre p53 et Pyk2. Ces résultats préliminaires doivent être reproduits et confortés notamment par la mesure des niveaux d'ARNm de p53 après transfection dans les cellules MEF A- et AP- des ADNc pcDNA3, Pyk2 WT ou Pyk2 mutée (Y402F).

Les derniers travaux préliminaires réalisés concernent l'inhibition de Pyk2 par l'inhibiteur non sélectif PF-431396 et son effet sur p53. PF-431396 inhibe l'autophosphorylation de Pyk2 en se fixant sur son site de liaison à l'ATP pour entrer en compétition (S. Han et al. 2009). Une dose réponse (0, 1, 5, 10 et 20  $\mu$ M) a été réalisée pendant 16h sur les cellules MEF A- et AP-. On confirme bien une baisse de l'expression de Pyk2 proportionnelle à la concentration d'inhibiteur. Aux plus fortes concentrations (10 et 20  $\mu$ M), l'inhibition de Pyk2 entraîne une augmentation de p53 endogène (*Figure 36*).

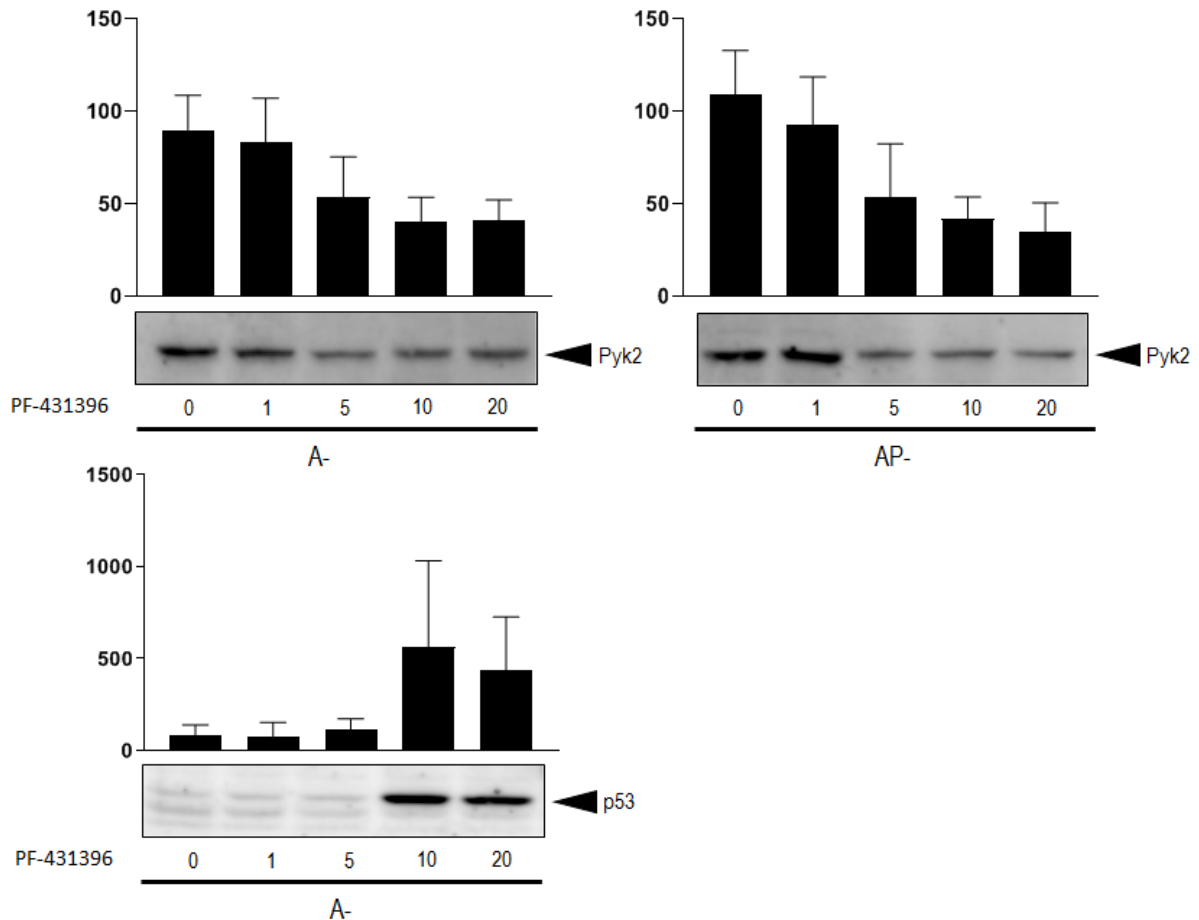


Figure 36 : expression de Pyk2 et p53 après traitement 16h de l'inhibiteur PF-431396 dans les cellules MEF Arf<sup>-/-</sup> et MEF Arf<sup>-/-</sup> ; p53<sup>-/-</sup>

Dans les cellules AP<sup>-</sup>, il est malheureusement compliqué d'observer l'expression de p53. Dans nos expériences, nous n'avons pas pu voir si le fait de diminuer Pyk2 augmentait p53, ce qui est le cas dans les cellules A<sup>-</sup>.

### 3- Discussion :

La tyrosine kinase Pyk2 a été identifiée dans de multiples études GWAS comme un facteur de risque de la MA tardive (Kamboh et al. 2012) (Jean-Charles Lambert et al. 2013) (Beecham et al. 2014) (Jiao et al. 2015) (Y.-Q. Li et al. 2016) (Nettiksimmons et al. 2016) (E. Lin et al. 2017), et au moins un variant de gène *PTK2B* est associé à la MA (rs28834970) entraînant une augmentation de l'expression de Pyk2 dans les monocytes humains (Chan et al. 2015). De même que la PrPc, qui est un récepteur des oligomères d'A $\beta$ , s'associe au récepteur métabotrope du glutamate 5 (mGluR5), servant d'intermédiaire pour se lier à Homer1b/c, Pyk2 et CamKII (Haas et Strittmatter 2016) (Haas et al. 2016) (Haas et al. 2017). La signalisation par PrPc et mGluR5, qui comprend l'activation de Pyk2, est perturbée par les oligomères d'A $\beta$  (Haas et Strittmatter 2016). Ainsi le métabolisme de  $\beta$ APP, entraînant la production de nombreux catabolites dont certains sont potentiellement responsables de la



physiopathologie de la MA et notre laboratoire disposant d'un grand nombre d'outils pour l'étudier, nous avons choisi d'observer l'effet de Pyk2 sauvage et de sa forme mutée Y402F (abolissant son activité kinase) sur ce dernier, comme cela a été fait sur SorLA. Cependant nous ne sommes qu'au début de nos recherches. En effet je n'ai eu le temps que de générer le mutant Y402F et d'observer dans les cellules HEK-293 et SH-SY5Y naïves, APP-WT et APP-SWE l'expression de  $\beta$ APP, la sécrétion de sAPP $\alpha$  et l'expression des CTF (C99 et C83). Dans les cellules HEK-293 surexprimant stablement APP-WT et APP-SWE, des résultats encourageants ont permis d'observer une augmentation de l'expression de  $\beta$ APP dans les cellules transfectées transitoirement Pyk2 WT et cette augmentation est abolie avec Pyk2 Y402F. De même que dans ces mêmes cellules, on observe une augmentation de la sécrétion du sAPP $\alpha$  et de l'expression de C83 (mais pas C99) quand les cellules sont transfectées transitoirement avec Pyk2 WT. A nouveau cet effet est aboli avec Pyk2 Y402F. Ainsi, le fait que la surexpression de Pyk2 WT augmente l'expression de  $\beta$ APP, la sécrétion de sAPP $\alpha$  et l'expression de C83 suggère qu'elle soit potentiellement impliquée dans le métabolisme de  $\beta$ APP et particulièrement la voie non-amyloïdogène puisque sAPP $\alpha$  et C83 sont impactés, et non C99, le précurseur du peptide amyloïde A $\beta$ . Ces résultats sont renforcés par le fait que Pyk2 Y402F perd cet effet. Malheureusement, les mêmes expériences réalisées dans les cellules SH-SY5Y ne montrent aucun effet. Comme je l'explique dans mes résultats, le modèle SH-SY5Y a ses limites. Il correspond à des cellules nerveuses embryonnaires qui ne sont pas différenciées (neuroblastes) et il serait certainement intéressant de les reproduire dans des SH-SY5Y différenciées même si le protocole est très fastidieux (Shiple, Mangold, et Szpara 2016). Une autre possibilité serait les cultures primaires de neurones de souris par exemple. Ainsi, ces résultats doivent bien évidemment être reproduits et d'autres acteurs de ce métabolisme doivent être étudiés. Cependant, contrairement à notre étude sur SorLA, la mutation Y402F n'est pas décrite comme impliquée dans la MA. L'autophosphorylation de Pyk2 sur la tyrosine en position 402 joue un rôle clé dans de multiples signaux intracellulaires, y compris l'activation de la migration dans les macrophages (Okigaki et al. 2003) et les cellules cancéreuses (C. K. Sun et al. 2008) (Lim et al. 2010), et la résorption osseuse dans les ostéoclastes (Lakkakorpi et al. 2003) (Bruzzaniti et al. 2009). Pyk2 contribue notamment à la croissance des neurites et à la plasticité synaptique (Burgaya et al. 1995) (Derkinderen et al. 1998) (Girault et al. 1999) (Menegon et al. 1999) (Y.-Q. Huang et al. 2001) dans le SNC. Il a été démontré que Pyk2 agit comme un lien de signalisation pour l'induction de la LTP dans l'hippocampe CA1. L'activation de Pyk2 est nécessaire à l'activation en aval de la protéine Src, qui régule l'activité des récepteurs NMDA dans ce processus (Y.-Q. Huang et al. 2001).

Dans un deuxième temps, Pyk2 est largement décrit dans les cancers, notamment par son rôle dans la migration cellulaire (Walkiewicz, Girault, et Arold 2015) (Naser et al. 2018). En l'absence de stimulus, la protéine Pyk2, majoritairement cytoplasmique, a une conformation fermée non active, mais lorsque la concentration intracellulaire

en calcium  $Ca^{2+}$  augmente, elle se dimérise entraînant l'autophosphorylation de son site Y402 qui la rend active et s'accumule dans le noyau où elle interagirait avec le suppresseur de tumeur p53. Notre laboratoire, disposant d'un grand nombre d'outils pour étudier un lien potentiel entre Pyk2 et p53, nous avons choisi de travailler dans des cellules MEF Arf<sup>-/-</sup> ; p53<sup>-/-</sup> (AP-) et leur contrôle MEF Arf<sup>-/-</sup> (A-). Tout d'abord, nous avons observé que les cellules dépourvues de p53 (AP-) expriment moins Pyk2 que les cellules A-. Ensuite, dans les cellules MEF A- et AP-, le fait de surexprimer Pyk2 WT et mutée (Y402F) réduit l'activité transcriptionnelle de p53. Enfin, lorsque l'on traite les cellules A- et AP- 16h avec un inhibiteur non spécifique de Pyk2 (le PF-431396 en dose réponse 0, 1, 5, 10 et 20  $\mu$ M), on constate bien l'inhibition de l'expression de Pyk2 dans les 2 types cellulaires, et dans les A-, pour lesquelles on arrive à révéler p53, une augmentation de cette dernière pour les concentrations en inhibiteur les plus fortes (10 et 20  $\mu$ M) est observée. Ainsi, nos résultats préliminaires sont encourageants. Ils démontrent un lien potentiel entre Pyk2 et p53. D'autant plus que la protéine FERMT2, un autre facteur de risque, est caractérisée comme un partenaire direct de p53 (Sossey-Alaoui et al. 2019) et que l'équipe du Dr Lambert étudie l'effet de l'inhibition de Pyk2 sur l'activation de FERMT2. Ainsi, l'analyse en parallèle de Pyk2 et FERMT2 en lien avec p53 reste intéressante. Ces résultats méritent d'être reproduits pour être validés et d'autres expériences peuvent être réalisées comme notamment les niveaux d'ARNm de p53 après transfection dans les cellules MEF A- et AP- des ADNc pcDNA3, Pyk2 WT ou Pyk2 mutée (Y402F).

## 10- DISCUSSION ET PERSPECTIVES

L'hypothèse majeure, bien qu'encore très discutée, concernant l'étiologie de la MA est l'hypothèse amyloïde qui envisage les dépôts de peptide  $A\beta$  42 comme responsables des troubles cognitifs. Ce peptide est issu de la protéine  $\beta$ APP. L'hypothèse amyloïde est, au départ, basée sur l'observation forte de mutations autosomales dominantes qui, en général, concourent à la modification des niveaux de peptides  $A\beta$ . Ces mutations ne rendent pas compte de la majorité des formes sporadiques dans lesquelles les facteurs de risque pourraient contribuer à l'âge de début et/ou à la progression de la maladie. Notre laboratoire s'intéresse à la possibilité que certains de ces facteurs de risque contribuent à la cascade amyloïde en modulant directement ou indirectement les divers acteurs enzymatiques ou catabolites de la  $\beta$ APP.

Notre hypothèse de départ concerne un de ces facteurs de risque, le produit du gène *SORL1* (C. Pottier et al. 2012) dont 7 mutations ont été identifiées comme possiblement impliquées dans la MA puisque issues du séquençage du génome de 14 patients atteints de la maladie. J'ai donc examiné, grâce à un très large panel d'outils génétiques et pharmacologiques, l'influence de ces mutations sur la maturation physiopathologique de la  $\beta$ APP.

## A- Est-ce que les 7 mutations de SorLA découvertes ont un effet sur la maturation protéolytique de la protéine $\beta$ APP ?

Dans un premier, nos résultats sur SorLA<sup>WT</sup> sont en accord avec la majorité des travaux déjà publiés, c'est-à-dire que la surexpression de SorLA sauvage augmente l'expression de  $\beta$ APP et diminue les niveaux de ses catabolites (sAPP $\alpha$ , C99, C83 et A $\beta$ ) par rapport au contrôle (vecteur vide). Ces résultats ont été retrouvés dans les publications suivantes : (Caglayan et al. 2014) décrit qu'A $\beta$  diminue chez souris surexprimant SorLA<sup>WT</sup> ; (Vardarajan et al. 2015) observe qu'A $\beta$  et sAPP $\alpha$  diminuent ; de même pour (Cuccaro et al. 2016), ce qui indique que nos modèles sont pertinents.

Cependant, dans son ensemble, notre étude, basée sur 3 des 7 mutations décrites et qui sont SorLA<sup>141</sup>, SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup>, montre qu'ils ne modulent pas ou peu le métabolisme de la protéine  $\beta$ APP par rapport à la forme sauvage de la protéine SorLA<sup>WT</sup>.

En effet, dans les HEK-293, cellules dans lesquelles nous avons le plus étudié le métabolisme de la protéine  $\beta$ APP, ni son expression, ni la sécrétion du fragment sAPP $\alpha$  (le fragment issu de la  $\beta$ APP suite au clivage  $\alpha$ -sécrétase), ni l'activité  $\alpha$ -sécrétase, ni la production/sécrétion du peptide A $\beta$  total ou sous ses formes 40 et 42, ni les membres du complexes  $\gamma$ -sécrétase (complexe responsable du clivage de C99 en peptide A $\beta$ ), ni l'activité  $\gamma$ -sécrétase, ni l'expression de C83, ni l'activité  $\beta$ -sécrétase, ni l'activité de la neprilysine (une enzyme impliquée dans la dégradation du peptide A $\beta$ ), ni l'activité de la cathepsine B (une enzyme impliquée dans la dégradation des fragments C99 et C83) ne sont modifiés par les 3 mutants de SorLA étudiés par rapport à SorLA<sup>WT</sup>.

Aux vues des résultats décrits ci-dessus, aucune explication particulière ne peut éclaircir les observations faites sur 2 exceptions qui sont, tout de même, à noter : le mutant SorLA<sup>141</sup> réduit l'expression du fragment C99 (le fragment issu de la  $\beta$ APP suite au clivage  $\beta$ -sécrétase) dans les cellules HEK-293 APP-WT transfectées transitoirement et traitées au NH<sub>4</sub>Cl (qui inactive les hydrolases lysosomales par alcalinisation) par rapport à SorLA<sup>WT</sup>. Il réduit également l'expression de C99 dans les cellules HEK-293 APP-SWE transfectées transitoirement, traitées ou non au NH<sub>4</sub>Cl. L'autre exception est le mutant SorLA<sup>924</sup> qui augmente les niveaux d'A $\beta$  totaux et plus particulièrement l'A $\beta$  42 (mais pas le 40) dans les cellules CHO APP-WT transfectées stablement par rapport à SorLA<sup>WT</sup>. Est-ce que ces observations sont liées au fait que le trafic des mutants puisse être modifié ? Nous avons observé que la colocalisation du mutant SorLA<sup>924</sup> était réduite par rapport à SorLA<sup>WT</sup> ce qui pourrait se traduire par un moins bon recyclage de  $\beta$ APP par la protéine.

Les 3 mutants étudiés (SorLA<sup>141</sup>, SorLA<sup>511</sup> et SorLA<sup>924</sup>) peuvent potentiellement influencer d'autres voies et notamment celle de tau, le 2<sup>ème</sup> marqueur histopathologique après le peptide A $\beta$ , ou l'atrophie de l'hippocampe (Louwersheimer et al. 2015). En effet, l'allèle rs2070045-G du SNP *SORL1* semble lié à tau dans le LCS de patients et à l'atrophie de l'hippocampe, 2 marqueurs endophénotypiques de la MA, ce qui suggère que *SORL1* pourrait être impliqué dans la pathologie en aval. Tout comme, il reste 4 autres mutations à étudier : SorLA<sup>1358</sup>, SorLA<sup>1478</sup>, SorLA<sup>1681</sup> et SorLA<sup>1821</sup>. De même que les mutations étudiées sont présentes dans différents domaines de la protéine SorLA (domaine Vps10p, structure  $\beta$ -propeller, domaine transmembranaire). Certains variants sont également décrits comme altérant la maturation et le trafic de SorLA suite à des changements dans les interactions interatomiques (Rovelet-Lecrux et al. 2021). Dans 2 études, on peut même observer des discordances sur l'effet de SorLA sauvage par rapport aux cellules contrôle de même type cellulaire. Ainsi Cuccaro (Cuccaro et al. 2016) observe une plus grande réduction d'A $\beta$ 40 sécrété alors que les résultats de Vardarajan (Vardarajan et al. 2015) montrent une baisse moins prononcée. De plus Cuccaro observe une importante baisse d'APP $\alpha$  sécrété à l'inverse de Vardarajan. De même que dans la même étude Vardarajan n'observe pas les mêmes effets de 2 mutations présentes toutes les 2 dans le domaine Vps10p.

Finalement, ce sont 971 mutations qui ont été retrouvées sur le gène *SORL1* (<https://www.alzforum.org/mutations/sorl1>).

## B- Est-ce que la protéine Pyk2 est impliquée dans la maturation protéolytique de la protéine $\beta$ APP ?

A notre connaissance, notre étude, bien qu'encore fragmentaire, est la toute première examinant l'influence de Pyk2 sur p53 et la possibilité d'un dialogue fonctionnel entre les 2 protéines. Cette hypothèse est basée sur l'observation que Pyk2 contrôlerait l'activation de FERMT2, un autre facteur de risque identifié par GWAS. Or p53 est un partenaire direct de FERMT2 (Sossey-Alaoui et al. 2019). Nos résultats sont très encourageants puisque l'abolition de p53 réduit l'expression de Pyk2, alors qu'en retour, la surexpression de Pyk2 réduit l'activité transcriptionnelle de p53. Ces résultats ont été corroborés par l'observation que l'inhibition pharmacologique de Pyk2 augmente l'expression de p53. Ces résultats préliminaires ouvrent à court terme, des perspectives très intéressantes. Nous devons confirmer l'influence de p53 sur Pyk2 dans des modèles de cultures primaires de neurones et étudier l'influence de mutations pathogènes de p53 sur Pyk2 endogène. D'autre part, quel est l'effet de l'abolition de Pyk2 endogène sur l'expression et l'activité transcriptionnelle de p53 ? Il serait aussi intéressant d'identifier le rôle putatif de FERMT2 sur le dialogue fonctionnel entre Pyk2 et p53.

En lien direct avec la MA, il a été décrit dans le laboratoire et ailleurs que p53 pouvait réguler l'expression et la fonction de plusieurs acteurs impliqués dans la maturation

physiopathologique de la  $\beta$ APP. Ainsi, p53 est capable de réguler l'expression de la  $\beta$ APP (Alves Da Costa et al. 2006) (Cuesta et al. 2009). Il est aussi capable de réguler divers membres du complexe  $\gamma$ -sécrétases qui, en retour sont capables de moduler p53 dans une boucle de rétro contrôle fonctionnelle (Alves Da Costa et al. 2006) (Dunys et al. 2009) (Checler et al. 2010). D'autres études ont montré que le peptide A $\beta$  intracellulaire était capable de moduler la transactivation du promoteur de p53 (Ohyagi et al. 2005) et certains des membres de la  $\gamma$ -sécrétase pouvaient moduler la mort cellulaire dépendante de p53 (Dunys, Kawarai, Sevalle, et al. 2007) (Pardossi-Piquard et al. 2009). AICD contrôlerait p53 au niveau transcriptionnel. Nous avons donc conduit quelques expériences préliminaires concernant l'expression de la protéine  $\beta$ APP, la sécrétion du fragment sAPP $\alpha$  et l'expression des fragments C-ter C99 et C83 dans 2 types cellulaires, les HEK-293 et les SH-SY5Y, naïves, APP-WT et APP-SWE, transfectées transitoirement. Nous observons bien un effet de la surexpression de Pyk2<sup>WT</sup> dans les cellules HEK-293 par rapport au contrôle vecteur vide (sauf pour le fragment C99). En revanche il n'y a aucun effet dans les SH-SY5Y. Ces résultats potentiellement encourageants doivent être confortés et il serait notamment intéressant d'examiner si l'influence de Pyk2 sur l'expression et la fonction de p53 est dépendante de la présence de la  $\beta$ APP ou de la  $\gamma$ -sécrétase endogènes. De même l'influence de p53 sur le contrôle de la maturation protéolytique par Pyk2 sera examinée et pourrait être le révélateur d'un dialogue fonctionnel entre ces diverses protéines.

### C- Tous les candidats identifiés par GWAS sont-ils impliqués dans le métabolisme de la protéine $\beta$ APP ?

En 2022, 75 régions du génome associées à la MA ont été identifiées. Parmi elles, 42 sont nouvelles. Tester l'effet de chaque candidat sur le métabolisme de la  $\beta$ APP pourrait être une option mais il existe beaucoup d'autres voies impliquées : la neuroinflammation (microglie/astrocytes), le bas niveau de neurotransmetteurs/neurotrophines, le dysfonctionnement métabolique (mitochondries), le système vasculaire, la transmission (spreading) neurone à neurone ou neurone à astrocyte, ... (Pierre Dourlen et al. 2019). Sans compter les nouvelles pistes à explorer : le microbiote intestinal (Harach et al. 2017) (Y. Sun et al. 2020), les maladies parodontales (qui détruisent les tissus de soutien des dents) (Kamer et al. 2020) (D. T. Wu et al. 2023) ou les infections qu'elles soient bactériennes ou non (la toxoplasmose (Nayeri et al. 2021) et l'herpès (Wainberg et al. 2021) sont de potentiels facteurs de risque). D'ailleurs, l'équipe du Dr. Jean-Charles Lambert avait également tenté d'étudier l'effet d'un autre facteur de risque BIN1. Après des analyses dans différents modèles d'études cellulaires, aucun impact n'avait été observé sur le métabolisme de  $\beta$ APP (J Chapuis et al. 2013).

## D-La MA en 2023 ?

Actuellement, plus de 140 candidats-médicaments sont testés dans le monde. Les cliniciens s'accordent pour dire qu'il faudra envisager une médecine personnalisée et une approche de multi-thérapie pour tenter de guérir de la MA. Même si les recherches continuent sur des traitements symptomatiques, aujourd'hui ce sont les traitements dits « disease-modifiers » (qui modifient le cours de la maladie) qui sont au cœur des recherches. Récemment, 2 anticorps (Lecanemab et Donanemab) ont été décrits comme réduisant les dépôts amyloïdes. Ils sont autorisés aux Etats-Unis, mais en raison de leurs effets ténus et de plusieurs effets secondaires sérieux (œdèmes cérébraux, hémorragies cérébrales ou réaction liée à la perfusion), ils ne sont pas encore autorisés en Europe.

Dans le cadre des recherches scientifiques consacrées à la MA, de nouvelles technologies ont émergées. C'est notamment le cas de l'imagerie (plus précise). Les techniques de capture et de numérisation d'images du cerveau ou des cellules permettent de rendre visibles et interprétables des échantillons de cerveaux post-mortem. L'utilisation de cellules souches et/ou organoïdes a également permis d'améliorer les modèles de recherche. Enfin l'analyse des biomarqueurs s'est très fortement développée.

Finalement, aux vues des derniers travaux, ce n'est pas une mais plusieurs causes, ce n'est pas une mais plusieurs formes et ce n'est pas un mais plusieurs acteurs qu'il faut étudier. C'est notamment le cas des âges. En effet, il manque cruellement d'études sur les malades jeunes. Tout comme il ne faudrait pas se focaliser uniquement sur le cerveau mais s'étendre à l'ensemble du corps (alimentation, microbiote, santé cardiovasculaire, ...).

## 11- ANNEXES – ARTICLES GWAS

### A- Article 1 : ADAM30 Downregulates APP-Linked Defects Through Cathepsin D Activation in Alzheimer's Disease.

Letronne F, Laumet G, Ayrat AM, Chapuis J, Demiautte F, Laga M, Vandenberghe ME, Malmanche N, Leroux F, Eysert F, Sottejeau Y, Chami L, Flaig A, Bauer C, Dourlen P, Lesaffre M, Delay C, Huot L, Dumont J, Werkmeister E, Lafont F, Mendes T, Hansmannel F, Dermaut B, Deprez B, Hérard AS, Dhenain M, Souedet N, Pasquier F, Tulasne D, Berr C, Hauw JJ, Lemoine Y, Amouyel P, Mann D, Déprez R, Checler F, Hot D, Delzescaux T, Gevaert K, Lambert JC. EBioMedicine. 2016 Jul;9:278-292. doi: 10.1016/j.ebiom.2016.06.002. Epub 2016 Jun 2. PMID: 27333034

B- Article 2 : Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism.

Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysert F, Pottiez V, Deloison G, Vandeputte A, Ayrat AM, Mendes T, Desai S, Goate AM, Kauwe JSK, Leroux F, Herledan A, Demiautte F, Bauer C, Checler F, Petersen RC, Blennow K, Zetterberg H, Minthon L, Van Deerlin VM, Lee VM, Shaw LM, Trojanowski JQ, Albert M, Moghekar A, O'Brien R, Peskind ER, Malmanche N, Schellenberg GD, Dourlen P, Song OR, Cruchaga C, Amouyel P, Deprez B, Brodin P, Lambert JC; ADGC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. *Acta Neuropathol.* 2017 Jun;133(6):955-966. doi: 10.1007/s00401-016-1652-z. Epub 2016 Dec 8. PMID: 27933404

C- Article 3 : Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner.

Eysert F, Coulon A, Boscher E, Vreulx AC, Flaig A, Mendes T, Hughes S, Grenier-Boley B, Hanouille X, Demiautte F, Bauer C, Marttinen M, Takalo M, Amouyel P, Desai S, Pike I, Hiltunen M, Chéccler F, Farinelli M, Delay C, Malmanche N, Hébert SS, Dumont J, Kilinc D, Lambert JC, Chapuis J. *Mol Psychiatry.* 2021 Oct;26(10):5592-5607. doi: 10.1038/s41380-020-00926-w. Epub 2020 Nov 3. PMID: 33144711



## Research Paper

## ADAM30 Downregulates APP-Linked Defects Through Cathepsin D Activation in Alzheimer's Disease



Florent Letronne<sup>a,b,c,1</sup>, Geoffroy Laumet<sup>a,b,c,1</sup>, Anne-Marie Ayrat<sup>a,b,c,1</sup>, Julien Chapuis<sup>a,b,c,1</sup>, Florie Demiautte<sup>a,b,c,1</sup>, Mathias Laga<sup>d,e</sup>, Michel E. Vandenberghe<sup>f,g</sup>, Nicolas Malmanche<sup>a,b,c</sup>, Florence Leroux<sup>h,i</sup>, Fanny Eysert<sup>a,b,c</sup>, Yoann Sottejeau<sup>a,b,c</sup>, Linda Chamij<sup>l,j</sup>, Amandine Flaig<sup>a,b,c</sup>, Charlotte Bauer<sup>l,j</sup>, Pierre Dourlen<sup>a,b,c</sup>, Marie Lesaffre<sup>k</sup>, Charlotte Delay<sup>a,b,c</sup>, Ludovic Huot<sup>h,c,l</sup>, Julie Dumont<sup>h,c,h</sup>, Elisabeth Werkmeister<sup>b</sup>, Franck Lafont<sup>b</sup>, Tiago Mendes<sup>a,b,c</sup>, Franck Hansmann<sup>m,n</sup>, Bart Dermaut<sup>a,b,c</sup>, Benoit Deprez<sup>h,c,h</sup>, Anne-Sophie Hérard<sup>f,g</sup>, Marc Dhenain<sup>f,g</sup>, Nicolas Souedet<sup>f,g</sup>, Florence Pasquier<sup>o,p</sup>, David Tulasne<sup>k</sup>, Claudine Berr<sup>q</sup>, Jean-Jacques Hauw<sup>r</sup>, Yves Lemoine<sup>h,c,l</sup>, Philippe Amouyel<sup>a,b,c,p</sup>, David Mann<sup>s</sup>, Rebecca Déprez<sup>h,c,h</sup>, Frédéric Cheder<sup>l,j</sup>, David Hot<sup>h,c,l</sup>, Thierry Delzescaux<sup>f,g</sup>, Kris Gevaert<sup>d,e</sup>, Jean-Charles Lambert<sup>a,b,c,\*</sup>

<sup>a</sup> INSERM, U1167, Laboratoire d'Excellence Dérivés, F-59000 Lille, France

<sup>b</sup> Institut Pasteur de Lille, F-59000 Lille, France

<sup>c</sup> Univ. Lille, F-59000 Lille, France

<sup>d</sup> Department of Medical Protein Research, MR, Ghent, Belgium

<sup>e</sup> Department of Biochemistry, Ghent University, Ghent, Belgium

<sup>f</sup> CEA, DSV, I2BM, MIRCen, Fontenay aux Roses, France

<sup>g</sup> CNRS, UMR 9190, Fontenay aux Roses, France

<sup>h</sup> INSERM U1177, Drugs and Molecules for Living Systems, F-59000 Lille, France

<sup>i</sup> Institut de Pharmacie Moléculaire et Cellulaire, UMR 7275 CNRS, Laboratoire d'Excellence Dérivés, Nîmes, France

<sup>j</sup> Université de Nice-Sophia-Antipolis, Valbonne, France

<sup>k</sup> Univ. Lille, CNRS, Institut Pasteur de Lille, UMR 8161 – M3T – Mechanisms of Tumorigenesis and Targeted Therapies, F-59000 Lille, France

<sup>l</sup> Center for Infection and Immunity of Lille, CNRS UMR 8204, INSERM 1019, Lille, France

<sup>m</sup> INSERM, U854, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>n</sup> Department of Hepato-Gastroenterology, University Hospital of Nancy, Université Henri Poincaré I, Vandoeuvre-lès-Nancy, France

<sup>o</sup> Univ. Lille, Inserm, U1171 – Degenerative & Vascular Cognitive Disorders, Laboratoire d'Excellence Dérivés, F-59000 Lille, France

<sup>p</sup> CHR5U, Lille, France

<sup>q</sup> INSERM, U1061, Université de Montpellier I, Hôpital La Colombière, Montpellier, France

<sup>r</sup> AHPH-Raymond Escouffier Neurophysiology Laboratory, Insulte Hospital, Paris, France

<sup>s</sup> Institute of Brain, Behaviour and Mental Health, University of Manchester, Salford Royal Hospital, Salford, UK

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 25 April 2016

Received in revised form 31 May 2016

Accepted 1 June 2016

Available online 2 June 2016

## Keywords:

Alzheimer

APP

ADAM30

Amyloid

Metabolism

LTP

## ABSTRACT

Although several ADAMs (A Disintegrin-like and metalloproteases) have been shown to contribute to the amyloid precursor protein (APP) metabolism, the full spectrum of metalloproteases involved in this metabolism remains to be established. Transcriptomic analyses centred on metalloprotease genes unraveled a 50% decrease in ADAM30 expression that inversely correlates with amyloid load in Alzheimer's disease brains. Accordingly, in vitro down- or up-regulation of ADAM30 expression triggered an increase/decrease in A $\beta$  peptide levels whereas expression of a biologically inactive ADAM30 (ADAM30<sup>mut</sup>) did not affect A $\beta$  secretion. Proteomics/cell-based experiments showed that ADAM30-dependent regulation of APP metabolism required both cathepsin D (CTSD) activation and APP sorting to lysosomes. Accordingly, in Alzheimer-like transgenic mice, neuronal ADAM30 over-expression lowered A $\beta$ 42 secretion in neuron primary cultures, soluble A $\beta$ 42 and amyloid plaque load levels in the brain and concomitantly enhanced CTSD activity and finally rescued long term potentiation

**Abbreviations:** ADAM, A Disintegrin and Metalloprotease Domain; APP, amyloid precursor protein; BACE, Beta-site APP cleaving enzyme 1; BSA, bovine serum albumin; CamKII $\alpha$ , Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase II  $\alpha$ ; COFRADIC, combined fractional diagonal chromatography; CTSD, cathepsin D; GKAP1, G kinase-anchoring protein 1; IRSA, insulin receptor substrate 4; LTP, long term potentiation; MMP, metalloprotease; MRI, magnetic resonance imaging; PLA, proximity ligation assay; TD2, Type 2 diabetes.

\* Corresponding author at: Unité INSERM 1167, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 1, Rue du Professeur Calmette, F-59019 Lille, cedex, France.

E-mail address: [jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr](mailto:jean-charles.lambert@pasteur-lille.fr) (J.-C. Lambert).

<sup>1</sup> Contributed equally to this work.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiomed.2016.06.002>

2352-3964/© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).



alterations. Our data thus indicate that lowering ADAM30 expression may favor A $\beta$  production, thereby contributing to Alzheimer's disease development.

© 2016 The Authors. Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. Introduction

Alzheimer's disease is a complex, multifactorial, neurodegenerative disease. It is the leading cause of dementia in elderly people. The main pathologic features of Alzheimer's disease are neurofibrillary tangles and senile plaque formation in the brain. The latter is caused by the progressive deposition of mainly 39- to 43-amino acid amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) peptides generated by proteolytic cleavage of the amyloid precursor protein (APP). The systematic observation of changes in APP metabolism in monogenic forms of Alzheimer's disease suggested that the A $\beta$ /APP pathway is at the heart of the disease (Hardy and Selkoe, 2002). Even though the key role of APP processing in the etiology of Alzheimer's disease has been challenged in recent years, recent genetic and GWAS studies of sporadic forms of Alzheimer's disease seem to support the importance of dysfunction of APP metabolism and A $\beta$  peptide production, degradation in the pathophysiology of Alzheimer's disease (Lambert and Amouyel, 2011; Jonsson et al., 2012; Tian et al., 2013; Young et al., 2015).

The two major A $\beta$  peptide species (A $\beta$ <sub>39</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub>) are produced by the sequential endoproteolysis of APP by  $\beta$ -secretase and  $\gamma$ -secretase complexes. APP can also undergo non-amyloidogenic cleavage by  $\alpha$ -secretase within the A $\beta$  sequence, which thereby precludes A $\beta$  generation. The various enzymes and protein complexes involved in these secretase activities are increasingly well characterized:  $\beta$ -site APP cleaving enzyme 1 (BACE1) accounts for almost all the  $\beta$ -secretase activity, whereas a complex that includes presenilin 1 or 2 is responsible for the  $\gamma$ -secretase activity (De Strooper, 2003). More recently, an additional matrixin (MMP-MT5) has been shown to contribute to APP processing by acting upstream of the  $\beta$ -site (Willem et al., 2015; Baranger et al., 2016). Finally other N-terminal truncated A $\beta$  peptide species can be generated by other proteases besides BACE1 (Wang et al., 2006; Schönherr et al., 2016).

In contrast,  $\alpha$ -secretase activity is less well characterized even if several research groups have suggested that ADAM10 and ADAM17 are the major enzymes responsible for constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase-mediated pathways in the brain (Lammich et al., 1999; Kuhn et al., 2010). In addition to these direct cleavages taking place on APP, several additional proteins are likely to modulate APP levels by interfering with secretase activity, APP trafficking and/or APP degradation (Vincent and Cheder, 2012). This complex network of protein-protein interactions is however poorly characterized and the identification of its components should improve our understanding of APP biology and fate, and might enable the delineation of therapeutic approaches.

Given this context, we decided to focus on ADAMs and related proteins. Our study was inspired by several observations besides our knowledge of the involvement of ADAMs as  $\alpha$ -secretases (Rosenberg, 2009): (i) ADAMs and APP are involved in many different biological processes including brain development, plasticity and repair (Yang et al., 2006), and (ii) several matrix metalloproteases (MMP-2, -3 and -9) can degrade A $\beta$  peptides (White et al., 2006; Reitz et al., 2010; Carson and Turner, 2002). We therefore performed a multi-angle screen for new components of APP metabolism, with a focus on MMPs, ADAMs and related proteins. We postulated that differentially expressed MMPs, ADAMs and related proteins (when comparing expression in Alzheimer's disease brains and control brains) might be clues for their involvement in APP physiology.

## 2. Materials and Methods

Written informed consent was obtained from study participants or, for those with substantial cognitive impairment, from a caregiver,

legal guardian, or other proxy and the study protocols for all populations were reviewed and approved by the appropriate Institutional review boards of each country.

All animal experiments were approved by the local animal care and use committee (Comité d'Éthique en Expérimentation Animale du Nord-Pas de Calais, Lille, France).

### 2.1. Study Design

We postulated that uncharacterized MMPs, ADAMs or related proteins may be involved in the APP metabolism. The purpose of this study was thus to explore this possibility. Potential candidates were selected from transcriptomic analyses targeting MMPs/ADAMs expression using total RNAs extracted from the brain of AD cases and controls. The strongest variations in expression were validated in an independent sample of brains using a different technology. Potential correlation between amyloid deposition in the brain of AD cases and expression of our genes of interest were examined. This work allowed us to select ADAM30 for further exploration.

We developed ADAM30 over- or under-expression experiments in different cellular models to assess ADAM30 impact on the APP metabolism. Potential  $\alpha$ -,  $\beta$ - or  $\gamma$ -secretase activities of ADAM30 were examined. A without a priori research for ADAM30 substrates was performed using COFRADIC experiments. Impact of ADAM30 on APP metabolism through CTSD activation was tested using pharmacological or siRNA tools. All the experiments have been made at least in triplicates and by two independent manipulators for most of them. This work allowed us to demonstrate that ADAM30 modulates the APP metabolism through CTSD activity.

The *in vitro* observations were finally extended to an "Alzheimer-like" transgenic mouse model specifically over-expressing ADAM30 in neurons. Primary cultures of adult neurons were used to validate the results obtained from cell lines. Measurement of soluble A $\beta$ <sub>42</sub> and amyloid deposition were performed to corroborate the *in vitro* results in the mouse brains. Electrophysiological analyses were finally performed to extend the results to neuronal activity. All the analyses were performed in a blinded fashion. Our data demonstrated that ADAM30 over-expression led to a decrease in A $\beta$ <sub>42</sub> secretion in primary cultures, in soluble A $\beta$ <sub>42</sub> and amyloid deposition in the cerebral tissue and to a rescue of LTP in the Alzheimer-like mouse brain.

### 2.2. Microarray Analyses

The preparation of human brain samples is described in the Supplementary experimental procedures. Total RNA was extracted with a phenol/chloroform protocol (TRIzol® reagent, Invitrogen®, USA) from frozen frontal cortex brain tissue from one hundred fourteen Alzheimer's disease samples and one hundred sixty seven control samples. The quality of the total RNA extract was assessed with an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent) and the ribosomal 28S/18S RNA ratio was estimated with the system's onboard biosizing software. Twelve Alzheimer's disease cases and twelve controls were selected among the initial samples by applying the following two criteria: (i) a ribosomal 28S/18S RNA ratio of 1.0 or more; (ii) a Braak stage below 2 (for control samples) (Table S1) (Benisek et al., 2009).

Specific oligonucleotides for one hundred thirty two open reading frames (corresponding to MMPs, ADAMs, ADAMTSs and related proteins) were designed using OLIGOMER software (Mediagen) (Supplementary experimental procedures and Table S2; Benisek et al.,

2009). After synthesis, the oligonucleotides were purified to obtain a population that was homogeneous in terms of length (Sigma-Aldrich®, Germany). All oligonucleotides were 5'-functionalized with a C<sub>6</sub>H<sub>12</sub>NH<sub>2</sub> arm.

In order to decrease the potential influence of inter-individual variability in the control population, we compared the genetic expression of each Alzheimer's disease case with the pool of control samples (see the Supplementary experimental procedures). Complementary RNA corresponding to 10 µg of the initial mRNA extract was produced by amplification and labeled with a Cy5 or Cy3 fluorophore using a Fluorescent Linear Amplification Kit® (Agilent), according to the manufacturer's instructions. After hybridization, microarrays were analyzed as described previously (Beniseain et al., 2009, see the Supplementary experimental procedures). It is important to note that the analyses of the one hundred thirty two ADAMs, MMPs and related proteins were performed with a one thousand seven hundred seventy one gene microarray used in a previous project in our laboratory (Beniseain et al., 2009; Chapuis et al., 2009). Accordingly, the threshold for statistical significance was set to  $p < 10^{-5}$  (after Bonferroni correction), in order to select genes differentially expressed in the Alzheimer's disease brain.

### 2.3. Quantification of ADAM17, ADAM30, ADAM33 and ADAMTS16 mRNAs

Total RNA samples (from forty two controls and fifty one Alzheimer's disease cases) were randomly selected (see Supplementary material section) from among the samples not used in the transcriptomic experiments. Levels of ADAM17, ADAM30, ADAM33 and ADAMTS16 mRNAs were quantified as described by the supplier (Quantigene®, Panomics) (Canales et al., 2006), normalized against two different housekeeping genes ( $\beta$ -actin and  $\beta$ -glucuronidase; see the Supplementary material procedures) and were expressed in arbitrary units (AU). Comparisons were performed with a Mann-Whitney non-parametric test.

### 2.4. Immunohistochemistry Experiments

The brains used for immunohistochemistry (IHC) experiments were obtained at autopsy (at Lille University Medical Center) from Caucasian patients suffering from Alzheimer's disease and from Caucasian controls in whom the absence of Alzheimer's disease had been confirmed neuropathologically. These samples were not used in the transcriptomic experiments. In all patient samples, the neuropathologic features of Alzheimer's disease were confirmed by IHC and Western blot analysis of Tau, A $\beta$  and  $\alpha$ -synuclein (Delacourte et al., 2002). Brain samples were fixed in formalin for brightfield microscopy. Paraffin sections from the anterior frontal cortex (Brodmann area 10) were processed in an automatic Benchmark-XT system (Ventana, USA). Polydonal antibodies against a sixteen-amino acid polypeptide within the human ADAM30 protein (Table S3) were raised according to a standard protocol (with three months of immunization, Interchim®, France). Anti-ADAM30 antibody and pre-immune rabbit serum (both diluted at 1:500) were applied after sample heating and were revealed using a standard immunoperoxidase technique.

### 2.5. Analyses of APP Metabolism as a Function of ADAM30<sup>WT</sup> or ADAM30<sup>mut</sup> Expression

Plasmid constructions are fully described in the Supplementary experimental procedures.

SKNSH-SY5Y-APP<sup>WT</sup> and HEK293/HEK293-APP<sup>WT</sup> cell lines were respectively cultured in DMEM and DMEM/F12 supplemented with 10% serum FCS, 2 mM L-glutamine, 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin and (for SKNSH-SY5Y-APP<sup>WT</sup> only) 1% MEM NEAA (Invitrogen®, USA) at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>.

For the analysis of APP metabolism, SKNSH-SY5Y-APP<sup>WT</sup> and HEK-APP<sup>WT</sup> cell lines (300,000 cells per well at seeding) were transfected with pcDNA-Mock, pcDNA-ADAM30<sup>WT</sup>, pcDNA-ADAM30<sup>mut</sup>, shRNA pUG/ADAM30 vectors (500 µg) or siADAM30 (ON-TARGETplus ADAM30 siRNA, GE Dharmacon). Transient transfection was performed using an Exgene500 protocol (Fermentas®, France) in SKNSH-SY5Y-APP<sup>WT</sup> cells and a Fugene-HD protocol (Roche Diagnostics®, Switzerland) in HEK/HEK-APP<sup>WT</sup> cells, according to the respective manufacturers' instructions. siADAM30 were specifically transfected using Lipofectamine RNAi Max. Of note, because of the low endogenous level of ADAM30 expression, shRNA and siRNA targeting ADAM30 were first validated in SKNSH-SY5Y stably over-expressing ADAM30 (Fig. S12).

Forty-eight hours after transfection, supernatants were collected for the quantification of APP by-products and cells were lysed to assay for expression of ADAM30<sup>WT/mut</sup> or endogenous ADAM30 by Western blotting. A $\beta$ 1–40, A $\beta$ 1–42, sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$  were measured in sandwich ELISAs (INNOTEST®  $\beta$ -amyloid (1–42) and  $\beta$ -amyloid (1–40), Innogenetics, Ghent, Belgium), and the sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$  Assay kits (IBL-International®, Germany), according to the respective manufacturers' recommendations. Three independent, duplicate experiments were carried out for each mutant and measurements were performed twice for each sample.

For the BACE1 fluorometric assay, HEK293 cells were transfected with ADAM30<sup>WT/mut</sup> cDNAs. Forty-eight hours after transfection, cells were pipette-lysed with 50 µl of Tris-HCl (10 mM, pH 7.5) and monitored for BACE1 activity, as described previously (Andrau et al., 2003). For the  $\gamma$ -secretase activity assay, solubilized membranes were obtained from intact HEK293 cells transfected with ADAM30<sup>WT/mut</sup> cDNAs and analyzed as described previously (Sevalle et al., 2009).

For analyses of APPA $\beta$ , APPF690S and APPE691V metabolism, HEK293 cell lines (300,000 cells per well at seeding) were transfected with pcDNA-Mock or pcDNA-ADAM30<sup>WT</sup> (250 µg) and pcDNA-APP<sup>WT</sup>, pcDNA-APP<sup>A $\beta$</sup> , pcDNA-APP<sup>F690S</sup> or pcDNA-APP<sup>E691V</sup> (250 µg). Three independent, duplicate experiments were carried out for each mutant and all measurements were performed twice for each sample.

### 2.6. Identification of ADAM30 Substrates

Two HEK293-APP<sup>WT</sup> cell lines stably overexpressing ADAM30<sup>WT</sup> or ADAM30<sup>mut</sup> (HEK293-ADAM30<sup>WT</sup> and HEK293-ADAM30<sup>mut</sup>) were generated (as mentioned above, one advantage of the HEK293 cell line is the absence of endogenous ADAM30 expression; see the Supplementary experimental procedures). These HEK293 cell lines were used to perform a targeted COFRADIC analysis of N-terminal peptides in a highly complex mixture, whereas all internal peptides were disregarded. The combination of COFRADIC, SILAC and N-terminal tagging chemistries generates quantitative data on the modification status of the N termini of the proteins present in the mixture. This approach provides an overall profile of enzyme activities and substrates (Staes et al., 2011; see the Supplementary experimental procedures).

For the CTSD assay, recombinant ADAM30<sup>WT</sup> and ADAM30<sup>mut</sup> were generated by Genscript (Piscataway, USA) (see the Supplementary experimental procedures). The activity of recombinant human CTSD (R&D Systems, Lille, France) was measured via cleavage of a fluorogenic peptide substrate (Mca-PLGL-Dpa-AR-NH<sub>2</sub> from R&D Systems). CTSD (16 µg/ml) was pre-incubated at 37 °C for 30 min before being diluted eight-fold into 50 mM Tris-HCl, pH 7.5 buffer with 300 mM NaCl. Twenty-five microliter aliquots of enzyme sample were transferred into the wells of black 96-well microplates (Corning, Amsterdam, The Netherlands) and incubated with substrate at 37 °C for 40 min. The final volume of the incubation solution was 100 µl and the final reagent concentrations were 0.5 µg/ml of CTSD and 10 µM of substrate in a assay buffer (0.1 M sodium acetate and 0.2 M NaCl, pH 3.5). Fluorescence was measured using a Victor3 V1420 plate reader (Perkin Elmer,



Courtaubouff, France) fitted with a 340 nm excitation filter and a 410 nm emission filter. The fluorescence of substrate blanks was subtracted. To evaluate the effect of ADAM30<sup>WT</sup> or ADAM30<sup>mut</sup> on CTSD activity, CTSD was pre-incubated with 84 µg/ml of each protein prior to dilution and substrate addition. The observed CTSD activities were compared with that measured when CTSD was pre-incubated with 84 µg/ml of bovine serum albumin (Sigma, Lyon, France).

For measuring intracellular CTSD activity, the SKNSH-SY5Y-APP<sup>WT</sup> and HEK-APP<sup>WT</sup> cell lines (300,000 cells per well at seeding) were transfected with pcDNA-Mock, pcDNA-ADAM30<sup>WT</sup> or pcDNA-ADAM30<sup>mut</sup> vectors. After 48 h, cells were lysed and the time course of CTSD activity (0, 5, 10 and 15 min) was monitored using a fluorometric SensoLyte® Cathepsin D assay (AnaSpec®, USA).

For the cathepsin inhibition experiments, HEK-APP<sup>WT</sup> cell lines were transfected for 24 h with pcDNA-Mock, pcDNA-ADAM30<sup>WT</sup> or pcDNA-ADAM30<sup>mut</sup> vectors and then exposed for 24 h to pepstatin A (10 µM; Sigma-Aldrich, Germany), leupeptin (10 µM; Sigma-Aldrich, Germany) or E64-D (1 µM; Sigma-Aldrich).

Transient Co-transfection of CTSD siRNA (37.5 pmol ~0.75 µg, ON-TARGETplus CTSD siRNA, GE Dharmacon) and pcDNA3.1-ADAM30 vector (1.25 µg of DNA per well) was performed using Lipofectamine® 2000 Transfection Reagent (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations. After 36 h of transfection and 24 h of secretion (wash after 12 h of transfection), cells were finally lysed and supernatants were recovered. Cell extracts were analyzed by western blot to validate both ADAM30<sup>WT</sup> over-expression and CTSD under-expression.

By-products of APP metabolism were then quantified as previously described. Three independent duplicate/triplicate experiments were carried out and measurements were performed twice for each sample.

## 2.7. Western Blot

Antibody against CTSD was diluted at 1/5000. The primary antibodies used to detect ADAM30 were diluted at 1/1000. The antibody 6E10 was used for APP detection at 1/5000. A monoclonal mouse antibody was used to detect β-actin at 1/10000. Antibody references are indicated in Table S3. Immuno reactive complexes were revealed using the ECL™ Western Blotting kit (Amersham®). Membranes were digitized using the ChemiDoc MP System (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France).

## 2.8. Immunofluorescence and PLAs

The SKNSH-SY5Y-APP<sup>WT</sup> cell line was cultured on poly-L-lysine-coated glass coverslips (Lab-Tek® Chamber Slide System 2 wells, Nunc, Roskilde, Denmark) for 24 h. The cells were then transfected with pcDNA-ADAM30<sup>WT</sup>-GFP, pcDNA-ADAM30<sup>mut</sup>-GFP, pcDNA-ADAM30<sup>WT</sup> or pcDNA-ADAM30<sup>mut</sup> vectors. After 48 h, cells were fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature and further permeabilized with 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS. After blocking in 5% (w/v) BSA, fixed materials were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies (diluted 1/500 in PBS supplemented with 5% (w/v) BSA and 0.25% Triton X-100). After washing, appropriate secondary antibodies were used (diluted 1/400). Primary and secondary antibody combinations are described in Supplementary Table 3. The slides were read under a confocal microscope (Leica LSM 710) at the MICPAL microscopy facility at the Pasteur Institute of Lille (Lille, France).

For the PLAs, cells were washed with PBS and then fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 30 min at room temperature. Cells were permeabilized with 0.25% Triton X-100 in PBS for 10 min. After blocking in 1% bovine serum albumin (BSA), cells were incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies diluted in 1% BSA in PBS. The anti-CTSD antibody (Abcam, catalog number ab6313-100) was diluted 1/100 and the anti-ADAM30 antibody (Genetex, catalog number GTX117694) was diluted 1/50. Cells were then washed three

times in PBS. All reagents used in the PLAs were purchased from Olink Bioscience (Uppsala, Sweden). The PLAs were performed according to the manufacturer's instructions by using anti-CTSD and anti-ADAM30 as primary antibodies.

## 2.9. Transgenic Mouse Experiments

### 2.9.1. Mouse Models

Two conditional ADAM30<sup>fl/fl</sup> and ADAM30<sup>mut/fl</sup> transgenic mice were generated within a C57BL/6N background (Taconic, Germany). In brief, a construct containing the GAGGS promoter, a LoxP-NeomycineStop-LoxP cassette and the human Adam30<sup>WT</sup> or Adam30<sup>mut</sup> gene was introduced in the Rosa26 locus. CamKIIα-Cre mice (in which Cre gene expression is driven by the CamKIIα promoter (Tsien et al., 1996) and hAPP<sup>Swedish</sup> mice expressing a human APP gene bearing Swedish (670/671 KM-NL) and Indiana (717 V-F) mutations were obtained from The Jackson Laboratory (Mucke et al., 2000). Both mice have a C57BL/6J background. The first cross was between hAPP<sup>Swedish</sup> mice and CamKIIα-Cre mice, yielding APP<sup>+/+</sup>/Cre<sup>+/+</sup> mice. The second cross was between APP<sup>+/+</sup>/Cre<sup>+/+</sup> mice and hADAM30<sup>fl/fl</sup> or hADAM30<sup>mut/fl</sup> mice, yielding triple transgenic hADAM30-APP<sup>+/+</sup>/Cre<sup>+/+</sup> or hADAM30<sup>mut</sup>-APP<sup>+/+</sup>/Cre<sup>+/+</sup> mice expressing ADAM30 or ADAM30<sup>mut</sup> in their brains. The mice data were systematically obtained from a crossing of a hADAM30<sup>fl/fl</sup> heterozygous C57BL/6N female with an APP<sup>+/+</sup>/Cre<sup>+/+</sup> heterozygous C57BL/6J male without any backcross. So the genetic background has been systematically controlled and the phenotypes were analyzed only at the first generation.

All the mice were genotyped by PCR using genomic DNA isolated from tail tips, according to the provider's protocols (The Jackson Laboratory; Table S4 and Fig. S13). Mice were maintained on a standard diet with ad libitum access to water in a specific pathogen-free animal facility. The mice were studied at the age of 10 months ± 1 week. At sacrifice, the brains were removed. After sagittal section, one hemisphere was used for histological studies and the other was sectioned on brain matrices to isolate the cortices and hippocampi, which were then stored at -80 °C.

### 2.9.2. Aβ42 Peptide Assays

Following the validation of gene expression in the brain (see the Supplementary experimental procedures), snap-frozen hippocampi were homogenized in guanidine buffer (Johnson-Wood et al., 1997). Hippocampal levels of Aβ42 were quantified with commercially available ELISA kits (Immogenetics kit for Aβ42). The protein concentration in hippocampal extracts was determined using a Bradford assay kit (Bio-Rad Laboratories).

### 2.9.3. Measurements of CTSD Activity Ex Vivo

Cortex samples were homogenized with dithiothreitol-containing assay buffer from the SensoLyte 520 Cathepsin D assay kit (AnaSpec®, USA), using a high-power homogenizer. After centrifugation for 10 min at 12,000 rpm and 4 °C, supernatants were assayed for CTSD with the SensoLyte® Cathepsin D assay kit (AnaSpec®), according to the manufacturer's instructions. The CTSD activity was measured independently in two different experiments: a time-course measurement every 5 min between 0 min and 30 min and an end-point measurement at 30 min (Fig. 4). Each measurement was performed at least twice for each cortex sample and the results were normalized against the sample weight and protein concentration. At least three independent, duplicate experiments were carried out and measurements were performed twice for each sample. Comparisons were performed using a Mann-Whitney non-parametric test (for the end-point experiment) or a two-tailed *t*-test (for the time-course experiment).

### 2.9.4. Histology

Hemibrains from APP<sup>Sw/Ind</sup>, ADAM30<sup>WT</sup>/APP<sup>Sw/Ind</sup> and ADAM30<sup>WT</sup>/APP<sup>Sw/Ind</sup>/Cre mice were processed by a high-throughput neurohistological service (NeuroScience Associates). Briefly, hemibrains were embedded in a green-colored solid matrix (Multibrain technology) and cut along the rostrocaudal axis. For each brain, three sets of 30- $\mu$ m-thick coronal sections (one hundred per set) were collected. One set was used for A $\beta$ -peptide IHC experiments with a 6E10 monoclonal antibody and 3,3'-diaminobenzidine development. The other two series were stored for further analysis. Block-face photographs were taken (lateral resolution: 13  $\mu$ m) before each section was prepared (Canon EOS 5D Mark III) (Dubois et al., 2007). Histology images were digitized using a flatbed scanner (ImageScanner III, GE Healthcare) with a lateral resolution of 5  $\mu$ m.

### 2.9.5. 3D Reconstruction

All the image processing steps described below were performed using the BrainRAT pipeline 3D-HAPI (Dubois et al., 2007; Dubois et al., 2010; Vandenberghe et al., 2016) and a dedicated in-house image processing software package (BrainVISA, <http://brainvisa.info>). All image analyses were performed by operators blinded to the animal group assignments (Fig. S14). For each brain, block-face photographs and histological images were stacked. Brain tissue was automatically segmented on block-face photography volumes and masked to remove background. As block-face images were taken prior to sectioning at the same position section after section, reconstructed photographic volumes necessarily reflected the original shape of the frozen brains and were used as a 3D reference. Affine registrations between two-dimensional histological images and corresponding block-face photographs were estimated and used to (i) correct for deformations due to histological procedures and (ii) provide coherent histological volumes (xyz resolution: 5  $\times$  5  $\times$  90  $\mu$ m<sup>3</sup> for histological volumes stained with the 6E10 monoclonal antibody). For each animal, the block-face photography volume and the corresponding IHC volume stained with 6E10 monoclonal antibody were aligned within the same spatial reference framework.

### 2.9.6. Quantification of the Amyloid Load

A $\beta$  peptide aggregates were segmented from the rest of the image by applying a supervised Bayesian classifier (Chubb et al., 2006) to reconstructed 6E10 IHC volumes. Each voxel was classified into either positively stained amyloid plaques, non-stained tissue or background as a function of the color intensities (red, green and blue) and the mean neighborhood intensity (the mean red, green and blue intensities within the voxel's four-connected neighbors). A mouse hemibrain atlas was derived from a publicly available, magnetic resonance imaging (MRI)-based mouse brain atlas ([http://www.mouseimaging.ca/technologies/C57Bl6j\\_mouse\\_atlas.html](http://www.mouseimaging.ca/technologies/C57Bl6j_mouse_atlas.html)) (Dorr et al., 2008) and registered on each photographic volume according to a protocol described and validated elsewhere (Lebenberg et al., 2010). Briefly, non-linear transformations were estimated for each brain (using MRI) and then applied to corresponding label atlas volumes. The percent volume occupied by the 6E10 staining was computed for the forebrain as a whole and the hippocampus in particular. Quality controls were performed visually for both registration and color segmentation processes. Comparisons between amyloid loads were performed with a Mann-Whitney non-parametric test.

### 2.9.7. Electrophysiology Experiments

Mice were shipped to E-PHY-SCIENCE (Sophia-Antipolis, France). In this study, twenty six 12-month-old transgenic mice (hADAM30<sup>WT</sup>-hAPP<sup>Sw/Ind</sup>-Cre, hADAM30<sup>WT</sup>-hAPP<sup>Sw/Ind</sup>, hAPP<sup>Sw/Ind</sup>) and 8 WT mice were used. In total thirty four mice were sacrificed for the study. Of note, premature death is a phenotype of transgenic Alzheimer mice and no mice were lost in any of the groups during the course of the study. Acute slices (400  $\mu$ m thick) were prepared with a vibratome (VT 1000S; Leica Microsystems, Bannockburn, IL) in ice-cold gassed

aCSF enriched with sucrose. Sections were incubated in aCSF supplemented at 34 °C for 20 min and then kept at room temperature for at least 1 h before recording.

Recording was performed in a submerged chamber continuously perfused with aCSF, at 1–2 ml/min. A monopolar electrode was placed in the Schaffer collaterals, and stimulation was applied at 0.066 Hz (every 20 s) with stimulus intensity ranging from 0 to 100  $\mu$ A, yielding evoked field EPSPs (fEPSPs) of 0–0.3 V.

fEPSPs were recorded in the stratum radiatum using a borosilicate micropipette filled with aCSF.

The signal was amplified with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA), digitized by a Digidata 1200 interface (Molecular Devices) and sampled at 10 kHz with Clampex 10 (Molecular Devices). aCSF, during incubation and recording, was composed of the following (in mM): 119 NaCl, 11 D-glucose, 1.3 MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 1.3 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.5 KCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 2.6 NaHCO<sub>3</sub>, gassed with O<sub>2</sub>/CO<sub>2</sub> (95/5%) at least 20 min before use and throughout the experiment. Baseline was recorded for a minimum of 20 min or until stable. LTP was induced by stimulation with 100 Hz with four trains of a 1-s tetanus separated by 20 s.

Recordings were acquired using Clampex (Molecular Devices) and analyzed with Clampfit (Molecular Devices). Experimenters were blinded to treatment for all experiments. One or more slices from each mouse were used and were averaged, so that animals and not slices are considered biological replicates. Data were analyzed by measuring the slope of individual fEPSPs at 1–1.5 ms after the stimulus pulse by linear fitting using Clampfit (Molecular Devices).

### 3. Statistical Analyses

Statistical analysis was performed using SAS statistical software (version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

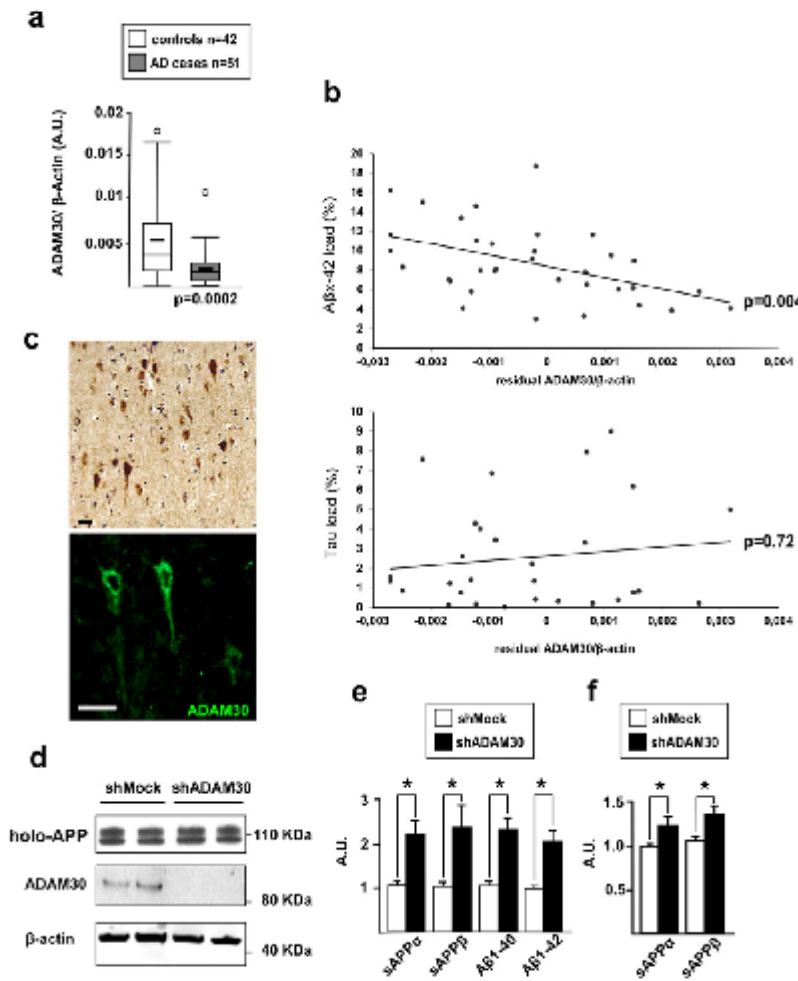
### 4. Results

#### 4.1. Transcriptomic Analyses Show That ADAM30 is Under-expressed in AD Brains

Using total RNA from the frontal cortex of twelve Alzheimer's disease cases and twelve healthy controls, we performed a transcriptomic analysis of one hundred thirty two genes coding for MMPs, ADAMs and related proteins (the complete results are provided in Table S2). Four ADAMs were found to be differentially expressed in the brain of Alzheimer's disease cases compared with controls (ADAM17, ADAM33, ADAMTS16 over-expressed and ADAM30 underexpressed;  $p < 1 \times 10^{-5}$  for all comparisons after Bonferroni correction; see the Materials and Methods section and in Bensemain et al. (2009)). Of note, since the analyses of the 132 ADAMs, MMPs and related proteins were performed using a 2741-gene homemade microarray (see again the Materials and Methods section and in Bensemain et al. (2009)), this design allowed us to determine whether the decrease in ADAM30 expression may be imputed to neuronal death. In order to evaluate this potential bias, we compared the expression of a subset of genes reported as only expressed in neuron ( $n = 113$ ) to genes not exclusively (or not) expressed in neurons ( $n = 1789$ ). Importantly, we did not observe any significant differences in terms of fold-change (Fig. S1). To bypass inherent risks of false positives in such systematic transcriptomic approaches despite of multiple testing corrections, the expression level of these four ADAMs was then analyzed in an independent, larger sample of AD cases (fifty one) and healthy controls (forty two). ADAM30 underexpression (Fig. 1a) and ADAM33 overexpression were confirmed whereas changes in the expression of ADAM17 and ADAMTS16 genes could not be validated in this larger sample (Fig. S2).

We finally assessed whether the levels of ADAM30/ADAM33 expression may be correlated with AD hallmarks in the brain. The decrease in ADAM30 expression was significantly correlated with higher A $\beta$ 42





**Fig. 1.** Characterization of ADAM30 expression in the brain. (a) Expression levels of ADAM30 in the brains of Alzheimer's disease cases (fifty one) and controls (forty two). All values are reported as arbitrary units (AU) following normalization against β-actin mRNA levels. All quantifications were carried out in triplicate in all individuals. The thick lines represent the median ADAM30 expression level in cases and controls. The midline represents the mean value and the upper and lower horizontal lines represent the first and third quartiles, respectively. Circles indicate individuals with extreme values (more than 2.5 SD above or below the mean value). p-Values refer to a Mann-Whitney non-parametric test. (b) Association of Aβ<sub>1-42</sub> and Tau loads in the brain of Alzheimer's disease cases with the expression of ADAM30 (residual correction), normalized against the expression of α-actin housekeeping gene. p values refer to Spearman's non-parametric test. (c) Immunohistochemistry experiments in human brain tissue supporting ADAM30 expression in neurons. (d) A representative experiment measuring transfection of a shRNA vector against ADAM30 into SKNSH-SY5Y-APP695<sup>WT</sup> cells (ADAM30 and β-actin). (e) Mean differences (±SEM) in the amounts of sAPP<sub>1-28</sub>, sAPP<sub>1-35</sub>, A-β<sub>1-40</sub>, A-β<sub>1-42</sub> in SKNSH-SY5Y-APP695<sup>WT</sup> cells or (f) endogenous sAPP<sub>1-28</sub>, sAPP<sub>1-35</sub> in SKNSH-SY5Y. Three independent experiments were performed in duplicate in SKNSH-SY5Y-APP695<sup>WT</sup> and in triplicate in SKNSH-SY5Y. \*p < 0.05 (Mann-Whitney non-parametric test).

loads but not with Tau loads in Alzheimer's disease brain samples (Fig. 1b and Fig. S3) while ADAM30 expression did not correlate with these Alzheimer's disease markers (data not shown). Immunohistochemistry experiments in human brain tissue revealed a neuronal expression of ADAM30 (Fig. 1c and Fig. S4) as observed in a laser dissection transcriptomic analysis (GSE15222 dataset described in Liang et al. (2008)). We thus hypothesized that ADAM30 under-expression might be harmful by modulating Aβ peptide production and thus, we assessed the putative involvement of ADAM30 in APP processing.

#### 4.2. ADAM30 Under-expression is Associated With Increased APP Catabolites In Vitro

We first investigated whether modulation of ADAM30 expression could be associated with an alteration of the APP metabolism in the SKNSH-SY5Y cell line stably expressing the wild-type (WT) APP<sup>WT</sup> isoform (SKNSH-SY5Y-APP<sup>WT</sup>). This model allows measuring the production/secretion of all APP byproducts and quantifying separately Aβ<sub>1-40</sub> and Aβ<sub>1-42</sub> peptides. ADAM30 under-expression (transient

transfection of SKNSH-SY5Y-APP<sup>695WT</sup> cells with a short hairpin RNA (shRNA) targeting ADAM30 (Fig. 1d)) increased the levels of all APP products yielded by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases-mediated proteolysis and particularly A $\beta$ <sub>1–40</sub> and A $\beta$ <sub>1–42</sub> (Fig. 1e). Both endogenous sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$  secretion were also increased in the SKNSH-SY5Y cells after transient transfection of ADAM30-shRNA (Fig. 1f) or of an ADAM30-siRNAs (data not shown).

#### 4.3. ADAM30 Catalytic Activity is Required for the Modulation of APP Metabolism

ADAM30 holds a unique zinc-binding motif HEXXHXXGXGH, which is normally required for enzymatic activity (all metalloproteases harbour a HEXXH motif and half of the ADAM proteins present such a functional catalytic motif). We thus aimed at determining whether the catalytic function of ADAM30 accounts for the observed modulation of APP catabolites. To assess this possibility we generated mammalian expression vectors expressing either a wild-type ADAM30 (ADAM30<sup>WT</sup>) or an ADAM30 with a mutated catalytic site (ADAM30<sup>mut</sup>, see Supplementary information). These constructs were transfected either in the SKNSH-SY5Y-APP<sup>695WT</sup> cell line or a HEK293 cell line also stably expressing the wild-type APP<sup>695</sup> isoform (HEK293-APP<sup>695WT</sup>).

Over-expression of ADAM30<sup>WT</sup> in both cell lines triggers the exact opposite effects observed when down-regulated ADAM30, i.e. decreased levels of all amyloidogenic and non-amyloidogenic APP catabolites (Fig. 2A and 2B). This effect was not observed after overexpression of catalytically silent ADAM30<sup>mut</sup> (Fig. 2a and b).

We next started evaluating pathways that could link ADAM30 and APP catabolites. Strikingly, the fact that all APP catabolites were decreased by ADAM30 could have indicated that ADAM30 acted upstream of secretases cleavages. One possibility could be that ADAM30 directly modulates APP levels but we showed that APP mRNA levels were not affected by ADAM30 modulation (Fig. S5). An alternative explanation would be that ADAM30<sup>WT</sup> (but not ADAM30<sup>mut</sup>) modifies  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase activities. Since several ADAMs has been proposed as genuine  $\alpha$ -secretases, we first examined this possibility. However, ADAM30 did not exhibit  $\alpha$ -secretase-like activity (Fig. S6a). Of note, ADAM30 is not present at the membrane (Fig. S6b, c). We also ruled out ADAM30 as a modulator of  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases, since overexpression of WT or mutated ADAM30 did not modify these activities (Fig. S7).

#### 4.4. Identification of ADAM30 Substrates and Subsequent Targets

The above data suggest that ADAM30 might modulate an intracellular pathway or an intermediate effector contributing to APP physiology. Thus, we systematically searched for direct ADAM30 substrates or further downstream targets by applying N-terminal combined fractional diagonal chromatography (COFRADIC) (Staes et al., 2011) and comparing the “stable isotope labeling with amino acids in cell culture” (SILAC)-labeled N-terminomes of HEK293 cells stably over-expressing either WT or catalytically inactive ADAM30 (Fig. 2b). We identified two thousand and two hundred thirty eight proteins, eighteen of which (characterized by twenty five distinct peptide sequences) had neo-N-terminal peptides with higher intensities in cells over-expressing ADAM30<sup>WT</sup>, suggesting a putative susceptibility to ADAM30-mediated proteolysis (Fig. 2d). Most of these eighteen proteins were involved in transcription and translation (e.g. histones and ribosomal proteins). Even though the latter might well be substrates for ADAM30, we suspected that this observation might reflect potential differential

extraction of proteins, e.g. potential differences in cell growth between HEK293-ADAM30<sup>WT</sup> and HEK293-ADAM30<sup>mut</sup> cell lines. After discarding all proteins linked to transcription and translation, only three peptides (and thus proteins) showed different ratios: insulin receptor substrate 4 (IRS4), cathepsin D (CTSD) and G kinase-anchoring protein 1 (GKAP1). We decided to focus on CTSD (see representative mass spectrum of the neo N-terminal peptide of CTSD, Fig. 2e). Indeed, the potential ADAM30 cleavage site identified in the COFRADIC experiment matched the CTSD endoproteolysis domain (residues 161–169) leading to a mature, active, lysosomal protease (Fig. 3A) (Benes et al., 2008). This latter observation suggests that ADAM30 acts as a CTSD maturation enzyme leading to enhanced cellular activity.

#### 4.5. CTSD Co-localizes With, and is Activated by ADAM30

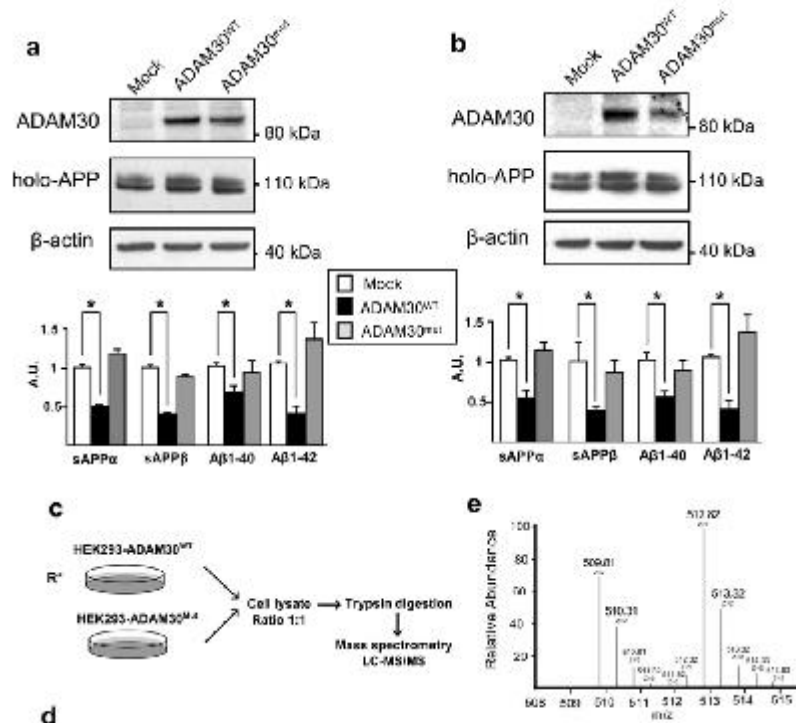
To further investigate the hypothesis whereby ADAM30 targets CTSD, we set up a fluorescence-based assay of CTSD activity. A human, recombinant pro-CTSD was incubated with its substrate in the presence or absence of human recombinant ADAM30<sup>WT</sup>, ADAM30<sup>mut</sup> or bovine serum albumin (BSA). Incubation with ADAM30<sup>WT</sup> increased CTSD activity, whereas this effect was not detected after incubation with either ADAM30<sup>mut</sup> or BSA (Fig. 3b). In native SKNSH-SY5Y and transiently transfected HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells, proximity ligand assay (PLA) revealed that respectively endogenous and overexpressed ADAM30<sup>WT</sup> co-localized with endogenous CTSD (Fig. 3c). Overexpression of ADAM30<sup>WT</sup> (but not ADAM30<sup>mut</sup>) was consistently associated with elevated CTSD activity in transiently transfected HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells (Fig. 3d) or SKNSH-SY5Y-APP<sup>695WT</sup> cells (Fig. 3e). Inversely, transfection of ADAM30-siRNA led to a decrease in CTSD activity in native SKNSH-SY5Y cells (Fig. 3f). Of note, mutagenesis of ADAM30<sup>mut</sup> did not appear to alter the protein compartmentalization when compared with the main localization of ADAM30<sup>WT</sup> in late-endosome (Fig. S8).

#### 4.6. CTSD Activity is Required for the Modulation of APP Metabolism by ADAM30

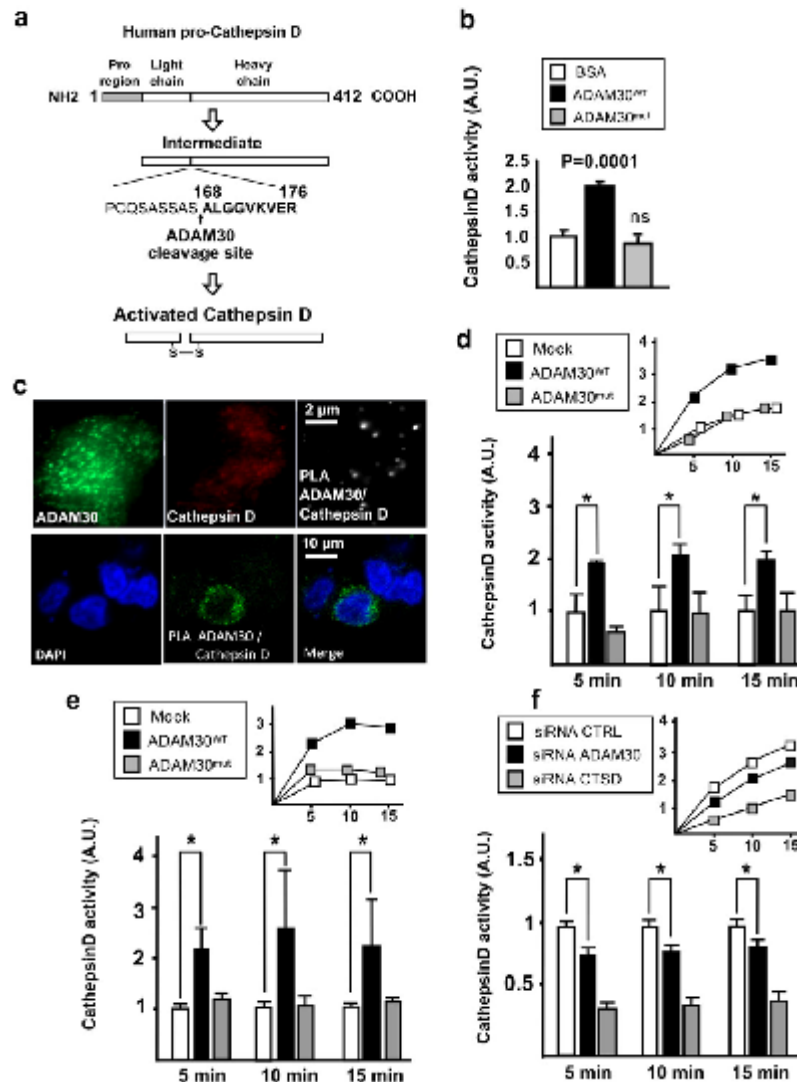
Both ADAM30's cellular localization and its ability to increase CTSD activity led us to postulate that ADAM30<sup>WT</sup> could contribute to the lysosomal CTSD maturation/activation and thereby, could favor APP degradation. This hypothesis may explain our observation of a general decrease in amyloidogenic and non amyloidogenic APP catabolites and agrees with our empirical observation that exposure to generic lysosome inhibitors (e.g. bafilomycin A1 and chloroquine) abolished ADAM30<sup>WT</sup>-mediated impact on cellular APP metabolism (Fig. S9).

We further investigated this hypothesis by testing the impact of different pharmacological inhibitors: pepstatin (an aspartyl protease inhibitor with activity mainly directed towards CTSD), leupeptin (a serine and cysteine proteinase inhibitor with selective activity against cathepsin B) and E64d (a cysteine proteinase inhibitor that targets CTSB, cathepsin L and calpain). In the presence of pepstatin, the effect of ADAM30<sup>WT</sup> expression in HEK293 cells was no longer detected (Fig. 4a). In contrast, leupeptin (a serine and cysteine proteinase inhibitor with selective activity against CTSB) did not alter the impact of ADAM30<sup>WT</sup> expression on APP metabolism in HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells (Fig. 4a). Similar results were obtained with E64d (Fig. 4a). Pepstatin could have elicited non-specific effect on the APP metabolism. In order to confirm the molecular cascade linking ADAM30, CTSD and APP, we finally down-regulated CTSD expression with a siRNA targeting CTSD in HEK293 cells over-expressing or not ADAM30<sup>WT</sup>. When CTSD was

**Fig. 2.** Representative experiment measuring ADAM30<sup>WT</sup> and ADAM30<sup>mut</sup> overexpression in (a) SKNSH-SY5Y-APP<sup>695WT</sup> and (b) HEK-APP<sup>695WT</sup> and mean differences ( $\pm$  SEM) in the secreted amounts of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A1- $\beta$ 40 and A1- $\beta$ 42. Three independent experiments were performed in duplicate. \*p < 0.05 (Mann-Whitney non-parametric test). (c) HEK293 cell lines stably over-expressing ADAM30<sup>WT</sup> or ADAM30<sup>mut</sup> and cultured them in SILAC medium supplemented with 12C- or 13C-labeled arginine, respectively. After lysis, equal amounts of proteins from the two samples were mixed, conditioned and then analyzed in a two-step HPLC process (see the Materials and Methods section). (d) Eighteen proteins (characterized by twenty five distinct peptide sequences in COFRADIC) were significantly over-represented in the HEK293-ADAM30<sup>WT</sup> cell line, as to the HEK293-ADAM30<sup>mut</sup> cell line. (e) A representative mass spectrum of the neo N-terminal peptide of CTSD (ALGGVSRK). The peptide with mass m/z 509.81 Da originates from the 12C6 arginine-labeled cell line (mutant cell line), whereas the peptide with mass m/z 512.82 Da originates from the 13C6 arginine-labeled cell line (WT cell line).



| Protein Name  | 12C/13C Ratio | Accession Number | Peptide sequence          |
|---|---------------|------------------|---------------------------|
| Inulin receptor substrate 4 (IRS-4)                     | 0.29          | Q14654           | SGGGKGGSGKSGDGDGER        |
| ATP-dependent RNA helicase DDX3X                        | 0.36          | Q05571           | SSDNQSGGSTASKGR           |
| 60S ribosomal protein L19                               | 0.55          | P64099           | IGKLAQCA <sup>+</sup> AR  |
| 40S ribosomal protein S30                               | 0.50          | P82881           | KKKK <sup>+</sup> TGR     |
| Histone H1.1  | 0.61          | Q02630           | AKAVKPKAAKAR              |
| Histone H1.3 (Histone H1c)                              | 0.61          | P16402           | AKKAGATAGKR               |
| 40S ribosomal protein S30                               | 0.62          | P82881           | KKKK <sup>+</sup> TGR     |
| Cathepsin D   | 0.65          | P67338           | ALGGVVMIR                 |
| 60S ribosomal protein L31                               | 0.67          | P62599           | PAKKGGEKKKGR              |
| 60S ribosomal protein L31                               | 0.69          | P62599           | SAINEV <sup>+</sup> TR    |
| Signal recognition peptide 16 kDa protein (SRP16)       | 0.66          | P37108           | MVLLESEGFLTELTR           |
| 60S ribosomal protein L31                               | 0.69          | P62599           | AKKGGK <sup>+</sup> KGR   |
| Histone H1.1  | 0.69          | Q02630           | AVKPKAAKAR                |
| 39S ribosomal protein L1, mitochondrial (3.4kb) (MRPL1) | 0.69          | Q0BYD3           | LSLAEAMR                  |
| 60S ribosomal protein L15                               | 0.69          | P61313           | KKGRV <sup>+</sup> MR     |
| Nucleoside diphosphate kinase B (NDP kinase B)          | 0.69          | P22592           | LVAMKPIR                  |
| 60S ribosomal protein L21                               | 0.70          | P46778           | TNTKGR                    |
| 60S ribosomal protein L35                               | 0.70          | P42755           | AKIKAR                    |
| G Kinase anchoring protein 1                            | 0.70          | Q8V8Y0           | ASAVLSVPTTASR             |
| 60S ribosomal protein L31                               | 0.70          | P62599           | APAKKGGK <sup>+</sup> KGR |
| 60S ribosomal protein L30                               | 0.70          | P62599           | VAAKIKKSLKLEINSR          |
| 60S ribosomal protein L16a                              | 0.70          | Q07543           | MKAGSTLR                  |
| 60S ribosomal protein L4                                | 0.70          | P36578           | SGGGAFGNMGR               |
| Protein DEK   | 0.70          | P36059           | SGVNSBELV <sup>+</sup> KR |
| 40S ribosomal protein S3a (Rb-1)                        | 0.71          | P61217           | AVGK <sup>+</sup> KR      |



**Fig. 3.** Characterization of CTSD activation by ADAM30. (a) Proteolysis of the pro-CTSD for CTSD activation. The black arrow shows the cleavage site for ADAM30 between amino acids 167 and 168 (corresponding to the activation processing of CTSD). (b) In vitro measurement of CTSD activity (mean  $\pm$  SD) after incubation of recombinant BSA, ADAM30<sup>WT</sup> or ADAM30<sup>mut</sup> with a CTSD peptide substrate. (c) Proximity ligation assay with human endogenous ADAM30<sup>WT</sup> and CTSD proteins in native SIONSH-SY5Y and with overexpressed ADAM30<sup>WT</sup> and endogenous CTSD in HEK293 cells. CTSD activity in HEK293-APP695<sup>WT</sup> (d) or SIONSH-SY5Y-APP695<sup>WT</sup> (e) cells transfected with ADAM30<sup>WT</sup>, ADAM30<sup>mut</sup> or empty vector (Mock). The CTSD activity was assayed in three independent experiments, with a measurement every at 5, 10 and 15 min (mean  $\pm$  SEM). Top-right: representative kinetic experiment. (f) CTSD activity in SIONSH-SY5Y cells transfected with ADAM30-siRNA. The CTSD activity was assayed in three independent experiments, with a measurement every at 5, 10 and 15 min (mean  $\pm$  SEM). Top-right: representative kinetic experiment. \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney non-parametric test). Three independent experiments were performed in duplicate.

down-regulated, the effect of ADAM30<sup>WT</sup> expression in HEK293 cells was again no longer detected (Fig. 4b).

Altogether, these results strongly suggested that ADAM30 might be involved in APP degradation via selective activation of lysosomal CTSD. In line with our previous results, it is noteworthy that in a HEK293 cell line stably overexpressing APP<sup>695WT</sup> and ADAM30<sup>WT</sup>, exposure to pepstatin was also associated with a 51% increase in intracellular

APP accumulation (relative to cells not overexpressing ADAM30<sup>WT</sup>;  $p < 0.01$ ; Fig. 4c).

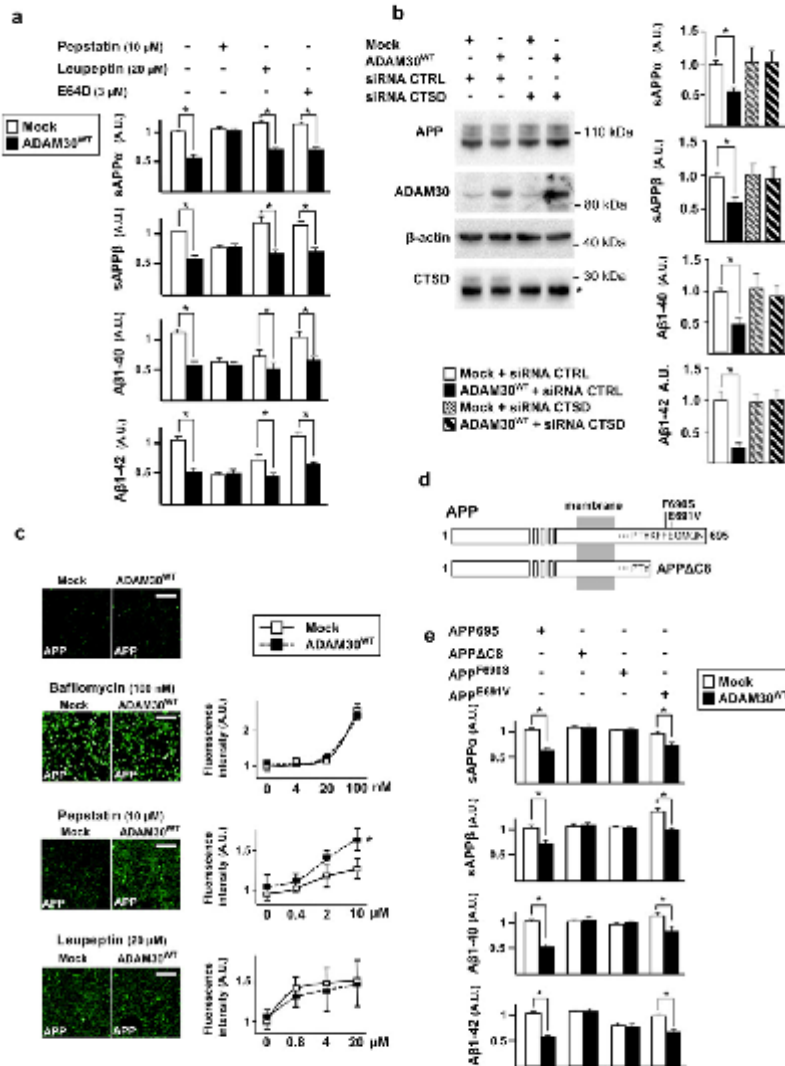
#### 4.7. Lysosome Sorting of ADAM30 is Required for its Modulation of APP

We finally assessed whether the consensus sequences for lysosomal sorting in the APP C-terminal tail (Lai et al., 1995; Kouchi et al., 1998;



Kouchi et al., 1999) was required for ADAM30<sup>WT</sup> impact on APP metabolism. In a first step, we mutated lysine 688 of APP<sup>F695WT</sup> into a stop codon (APP $\Delta$ C8) (Fig. 4d); this leads to deletion of the last eight C-terminal amino acids (the lysosome-addressing sequence YKFF, corresponding to YXX $\Phi$ , where  $\Phi$  is a highly hydrophobic residue) but does not modify the sequence controlling APP endocytosis. Fig. 4e shows

that the transient co-expression of APP $\Delta$ C8 and ADAM30<sup>WT</sup> in HEK293 cells abolished the decrease in APP catabolites associated with ADAM30<sup>WT</sup> expression. Further, we mutated phenylalanine at position 690 (APP<sup>F690S</sup>) into a serine residue within the lysosome-addressing sequence. Fig. 4e also shows that transient co-expression of APP<sup>F690S</sup> and ADAM30<sup>WT</sup> in HEK293 cells abolished the decrease in APP products



**Fig. 4.** Assessment of the impact of ADAM30 on the APP metabolism through CTSD activation. (a) Impact of pepstatin, leupeptin or B640 treatment in HEK293-APP695<sup>WT</sup> cells 48 h after transfection with ADAM30<sup>WT</sup> or mock vector. Cells were treated for 24 h at the indicated concentration. Mean differences ( $\pm$  SEM) in the amounts of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 are shown. (b) Impact of CTSD inhibition by siRNA on APP metabolism according to ADAM30<sup>WT</sup> over-expression. Mean differences ( $\pm$  SEM) in the amounts of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ 1-40 and A $\beta$ 1-42 are shown. (c) The impact of inhibiting APP degradation in HEK293-APP695<sup>WT</sup>, ADAM30<sup>WT</sup> cells. APP degradation was blocked by 24h of treatment with bafilomycin, pepstatin or leupeptin at the indicated concentration. Intracellular APP accumulation was assessed using immunofluorescence staining with 12E7 antibody against the N-terminal part of APP. Scale bar: 100  $\mu$ m. The graph represents the mean difference ( $\pm$  SEM) in fluorescence intensity per cell ( $n > 150$ ) for the indicated concentration. (d) Schematic representation of the different mutation used in the C-ter APP. (e) The impact of ADAM30 overexpression on the metabolism of C-ter-mutated APP in HEK293 cells. Mean differences ( $\pm$  SEM) in the secreted amounts of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , A $\beta$ 1-40, and A $\beta$ 1-42 are shown. In all panels, three independent experiments were performed in duplicate after 24 h of transfection. \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney non-parametric test).

associated with ADAM30<sup>WT</sup> expression. However, mutation of glutamic acid 691 (outside the lysosome-addressing sequence) into a valine (APP<sup>691V</sup>), did not modify ADAM30 wild-type phenotype. These results thus indicate that only a mutation within the lysosome addressing sequence (APP<sup>691E</sup>) abolished ADAM30-mediated impact on APP metabolism. Of note, we did not detect any modification on APP<sup>WT</sup> endocytosis in line with ADAM30<sup>WT</sup> over-expression (data not shown).

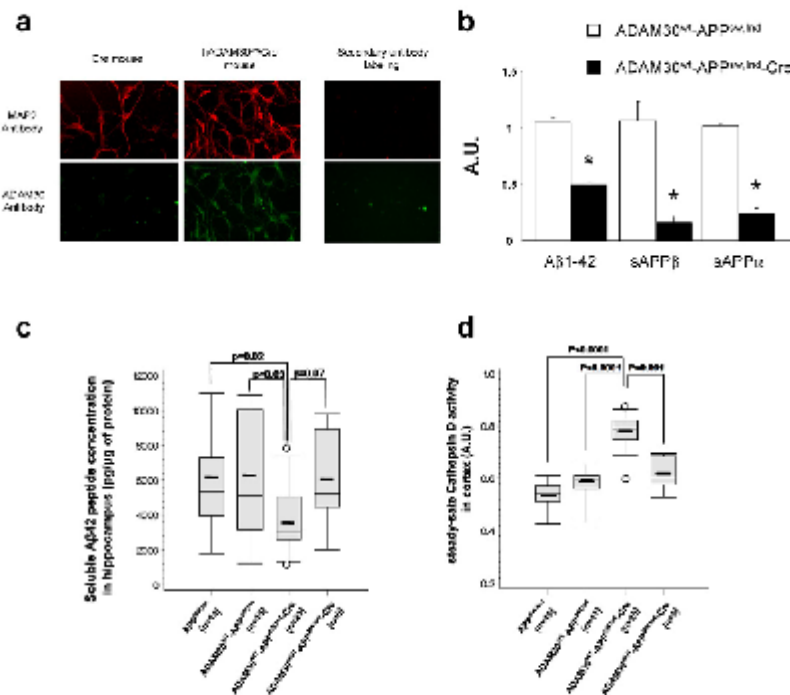
#### 4.8. Overexpression of ADAM30 Modulates A $\beta$ Production and Deposition In Vivo

To corroborate our observations in vivo and further evaluate the impact of ADAM30 on A $\beta$  peptide secretion and amyloidosis, we sought to generate a transgenic mouse model. It was not possible to develop ADAM30 knock-out mice (ADAM30 is not expressed in the mouse brain (Allen Brain Atlas, <http://www.brain-map.org> and our data, Fig. 5a and Supplementary Fig. 13) contrary to what we observed in humans. We thus generated APP<sup>SwInd</sup> mice that conditionally overexpressed hADAM30<sup>WT</sup> in the neurons of the forebrain (as previously mentioned, immunohistochemistry experiments were consistent with the expression of human ADAM30 in neurons in human brain tissue (Fig. 1c)). Primary cultures of adult neurons indicated that expression of ADAM30<sup>WT</sup> was only observed in neurons generated from

hADAM30<sup>WT</sup>-hAPP<sup>SwInd</sup>-Cre mice (Fig. 5a). As observed in cell lines, a decrease in APP catabolites was also observed in primary cultures of adult neurons expressing ADAM30<sup>WT</sup> (Fig. 5b).

We then extended our results by analyzing the level of soluble A $\beta$ 42 in the mouse hippocampus. We observed significantly lower hippocampal levels of soluble A $\beta$ 42 upon induction in mice overexpressing hADAM30<sup>WT</sup> (-39%, relative to hADAM30<sup>WT</sup>-hAPP<sup>SwInd</sup> mice;  $p = 0.03$ ). We also generated mice that conditionally overexpressed hADAM30<sup>mut</sup> in order to confirm that ADAM30-mediated potential effects are genuinely linked to its catalytic activity. Remarkably, we did not detect any lower levels of soluble A $\beta$ 42 in these mice overexpressing hADAM30<sup>mut</sup> (Fig. 5c). CTSD activity was also significantly higher in the cortex of mice overexpressing hADAM30<sup>WT</sup> (but not in those overexpressing hADAM30<sup>mut</sup>) than in hADAM30-hAPP<sup>SwInd</sup> mice (+34%,  $p < 0.0001$ , and +7%,  $p = 0.82$ , respectively; Fig. 5d). Interestingly, we also observed a negative correlation between CTSD activity and soluble A $\beta$ 42 concentrations in hADAM30<sup>WT</sup>-hAPP<sup>SwInd</sup>-Cre mice ( $p < 0.05$  in Spearman's correlation test, Fig. S10).

All these observations are in full accordance with our in vitro data and support the claim that our observed effects are indeed specifically due to ADAM30 enzymatic activity. Furthermore, our results support a direct link between ADAM30, CTSD activation and amyloid load.



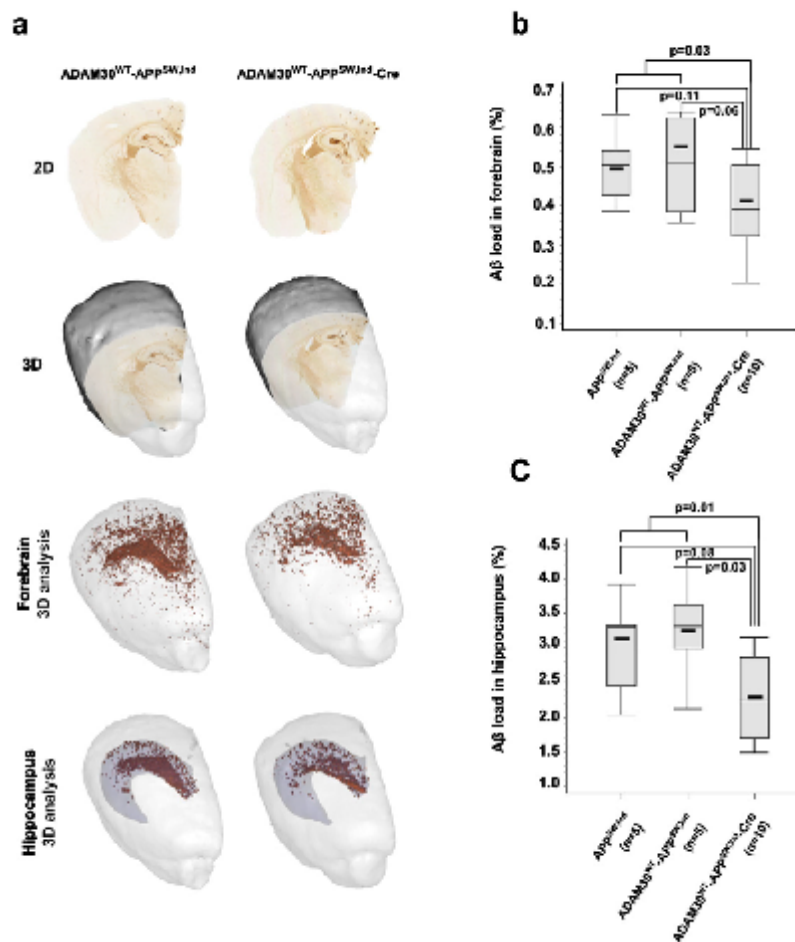
**Fig. 5.** Impact of ADAM30 over-expression in neurons and AD-like models on A $\beta$  secretion and CTSD activity. (a) ADAM30 expression at the protein level in adult neurons from 2-month-old mouse hippocampus ( $n = 3$ ). (b) Mean differences ( $\pm$  SEM) in the secreted amounts of sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$ , and A $\beta$ 1-42 in adult neurons (Div 19) according to ADAM30<sup>WT</sup> over-expression. Three independent experiments were performed in duplicate. \* $p < 0.05$  (Mann-Whitney non-parametric test). (c) Differences in levels of soluble A $\beta$ 1-42 peptide concentration in the hippocampi of different transgenic mice overexpressing ADAM30<sup>WT/mut</sup> or not. The thick lines represent the median A $\beta$ 1-42 level. The midline represents the mean value and the upper and lower horizontal lines represent the first and third quartiles, respectively. Circles indicate individuals with extreme values (more than 2 SD above or below the mean value).  $p$ -Values refer to a Mann-Whitney non-parametric test. (d) Differences in CTSD activity in the cortex of different transgenic mice overexpressing ADAM30<sup>WT/mut</sup> or not. The thick lines represent the median CTSD activity level. The midline represents the mean value and the upper and lower horizontal lines represent the first and third quartiles, respectively. Circles indicate individuals with extreme values (more than 2 SD above or below the mean value).  $p$ -Values refer to a Mann-Whitney non-parametric test.

To assess this possibility, we used a reliable, automated, high-throughput, three-dimensional (3D) histology method to determine the A $\beta$  load in mouse forebrain in general and the hippocampus in particular (see the Experimental procedures, Fig. 6a). Current standards for the analysis of brain histopathological markers heavily rely on manual intervention to delineate regions of interest and quantify the staining. Data collection is thus usually restricted to a few tissue sections. As a consequence, this approach allows avoiding eventual biases due to low section sampling rate as demonstrated elsewhere (Vandenberghe et al., 2016). By using this powerful approach, we observed that overexpression of hADAM30<sup>WT</sup> was associated with a 20% reduction in the A $\beta$  load ( $p = 0.03$ ; Fig. 6b) in the mice forebrain. As expected, this reduction was also observed in analysis restricted to the hippocampus ( $-28\%$ ,  $p = 0.01$ ; Fig. 6c).

#### 4.9. Overexpression of ADAM30 Partially Rescues LTP Deficits

Since APP catabolites have been shown to block hippocampal long term potentiation (LTP) and impair learning function in mice (Nalbantoglu et al., 1997), we aimed at establishing the functional impact of hADAM30 overexpression on LTP in hAPP<sup>Sw/Ind</sup> hippocampus. Several paradigms of basal synaptic transmission were analyzed: maximum fEPSP slope, Maximum fEPSP amplitude, maximum fiber volley amplitude and the function relating the stimulation intensity to fEPSP, which is an index of basal synaptic strength. None of these parameters were altered whatever the transgenic mice analyzed (Fig. 7a).

As expected, a LTP deficit was observed in hAPP<sup>Sw/Ind</sup> and hADAM30<sup>WT</sup>-hAPP<sup>Sw/Ind</sup> mice and this deficit was partially restored over time in hADAM30<sup>WT</sup>-hAPP<sup>Sw/Ind</sup>-Cre mice (Fig. 7a and b). Mean fEPSP for the



**Fig. 6.** Impact of ADAM30 over-expression in AD-like models on A $\beta$  loads. (a) Representative 2D sections and 3D reconstruction of the brains in mice overexpressing ADAM30<sup>WT</sup> or not. Illustration in the same mice of the spatial distribution of 3D segmented A $\beta$  peptide aggregates corresponding to forebrain and hippocampus regions. (b) The A $\beta$  load in the forebrain of APP<sup>Sw/Ind</sup> transgenic mice overexpressing ADAM30<sup>WT</sup> or not. (c) The A $\beta$  load in the hippocampus of APP<sup>Sw/Ind</sup> transgenic mice overexpressing ADAM30<sup>WT</sup> or not. Boxplots are as follows: The thick lines represent the median level. The midline represents the mean value and the upper and lower horizontal lines represent the first and third quartiles, respectively. Circles indicate individuals with extreme values (more than 2 SD above or below the mean value). p-Values refer to a Mann-Whitney non-parametric test.

different groups was calculated over the last 20 min of recording post-high frequency stimulation. A significant difference in LTP was observed between the  $\text{hADAM30}^{\text{WT}}$ - $\text{hAPP}^{\text{Sw/Ind}}$ -Cre mice and the other transgenic mice in which no potentiation was observed. Even if  $\text{ADAM30}^{\text{WT}}$  over-expression did not fully rescue potentiation, an about 60% recovery was observed (Fig. 7c).

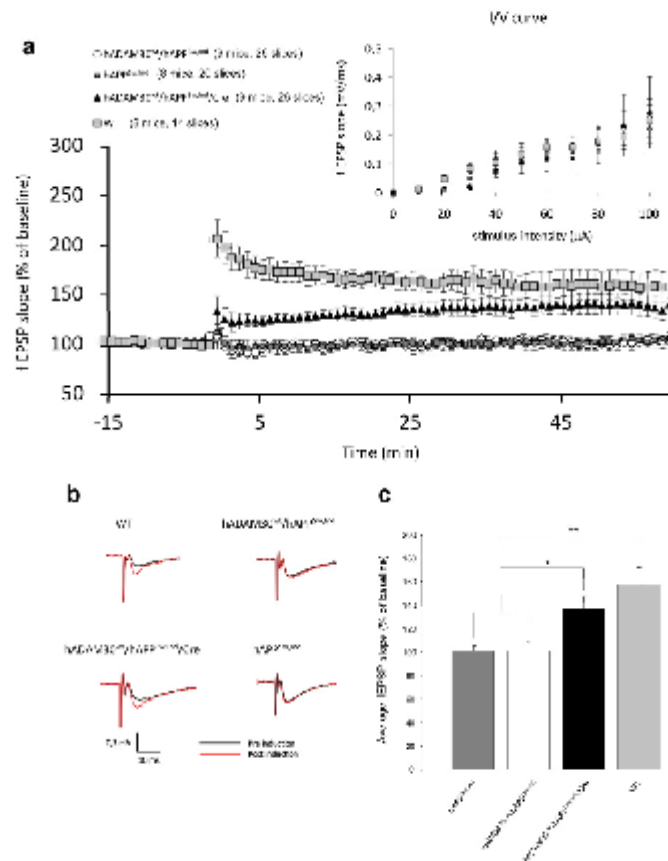
## 5. Discussion

One of the main difficulties in differential expression analyses of postmortem tissues relates to whether the variations detected are causes or consequences of the disease process. By means of a multidisciplinary approach involving various state-of-the-art techniques and novel original transgenic mouse models, we identified  $\text{ADAM30}$  as a player in APP metabolism and show that its underexpression likely directly contributes to Alzheimer's disease pathophysiology.

Very little is known about the physiological role of  $\text{ADAM30}$  (Cerretti et al., 1999; Hu et al., 2009; Ho et al., 2013; Alnawi et al.,

2013; Gupta et al., 2012; Ellis et al., 2014), its putative involvement in Alzheimer's disease and its protein partners. However, our results highlight a new axis in APP metabolism, with APP sorting to lysosomes,  $\text{ADAM30}$ -dependent CTSD activation and APP degradation. Overall, this set of data supports previous mechanistically unsolved observations of an important lysosomal contribution to the metabolism of APP (Funk and Kuret, 2012).

The potential APP degradation through  $\text{ADAM30}$ -dependent CTSD activation could be either linked to the CTSD activity by itself (CTSD was described to endoproteolyse the C100 APP fragment at multiple sites and to display  $\beta$ -secretase-like activity, *in vitro*) (Mackay et al., 1997; Chevallier et al., 1997) or to a CTSD-mediated subsequent activation of other hydrolases (Benes et al., 2008). In line with the recent description that PS1 mutations can be linked to defective lysosomal proteolysis (Lee et al., 2010), our data support the importance of the lysosome compartment in APP metabolism and as a consequence in the Alzheimer's disease pathophysiological processes.



**Fig. 7.** Impact of  $\text{ADAM30}^{\text{WT}}$  over-expression on LTP in Alzheimer-like mouse model. (a) LTP at the CA3-CA1 synapses of hippocampal slices induced by  $4 \times 100$ -Hz stimulation is impaired in  $\text{hADAM30}^{\text{WT}}$ - $\text{hAPP}^{\text{Sw/Ind}}$  (nine mice) and  $\text{hAPP}^{\text{Sw/Ind}}$  (eight mice) compared with WT mice (eight mice). Cre-dependent gene expression of  $\text{hADAM30}^{\text{WT}}$  in  $\text{hADAM30}^{\text{WT}}$ - $\text{hAPP}^{\text{Sw/Ind}}$ -Cre mice partially rescues LTP (nine mice). Inset graph shows input-output curves, which are comparable in  $\text{hADAM30}^{\text{WT}}$ - $\text{hAPP}^{\text{Sw/Ind}}$  (nine mice),  $\text{hAPP}^{\text{Sw/Ind}}$  (eight mice),  $\text{hADAM30}^{\text{WT}}$ - $\text{hAPP}^{\text{Sw/Ind}}$ -Cre (nine mice), and WT mice (eight mice). (b) Traces show the field excitatory postsynaptic potential (EPSP) from a representative animal from each group. Black traces represent the average of baseline recording before  $4 \times 100$ -Hz stimulation, red traces show the average over the last 20 min of post-stimulation recording. (c) Quantification indicating the percentage change in average EPSP amplitude 40–60 min after  $4 \times 100$ -Hz stimulation. Data are mean  $\pm$  SEM. \*\* $p = 0.0005$ , \*\*\* $p = 0.0015$  (Mann-Whitney non-parametric test).



We suspect that further investigation of other potential ADAM30 substrates might provide a better understanding of the ADAM30-dependent physiopathologic processes. Interestingly, all these targets can be directly or indirectly linked to insulino-resistance and/or APP metabolism. In one hand, GKAP1 was recently described to interact with IRS1 and to participate in insulino-resistance in adipocytes (Ando et al., 2015) whereas the ADAM30 locus was reported as a genetic risk factor for Type 2 diabetes (T2D) (Cerretti et al., 1999; Hu et al., 2009; Ho et al., 2013; Almawi et al., 2013; Gupta et al., 2012; Ellis et al., 2014). On the other hand, IRS, insulino-resistance and T2D were described as modulators of the Alzheimer's disease pathology through a potential modulation of the APP metabolism whereas CTSD was previously involved in APP processing *in vitro* (Dreyer et al., 1994; Mackay et al., 1997; Haque et al., 2008; Runk and Kuret, 2012). It is also noteworthy that IRS4 (also identified in our COFRADIC study) is able to directly interact with the Grb2 adaptor protein, a well-known actor of APP processing/sorting (Hinsby et al., 2004). Of note, since lysosomal proteolysis can represent a general mechanism for protein degradation/processing, we measured secreted catabolites of Met, a protein exhibiting a metabolism similar of APP (Lefebvre et al., 2012). We did not observe any modifications of the secreted Met products following co-transfection of Met and ADAM30 in HEK293 cells (Fig. S11). This observation suggests that the ADAM30-dependent CTSD-lysosome activation may be rather selective and that its metabolic consequences could be limited to a restricted number of proteins.

When considering the APP metabolism as a whole, our present findings (including the ADAM30-linked decreased secretions of APPs- $\alpha$  and - $\beta$  and A $\beta$  peptides) strongly suggest that either (i) ADAM30 is involved in a process that modifies the equilibrium between APP recycling (from early/late lysosomes to the membrane) and APP degradation in the lysosome or (ii) ADAM30 affects the cellular events that drives the dispatching of full-length membrane APP to either the endocytosis pathway or the lysosomal compartment, as was previously suggested (Lorenzen et al., 2010). However, it is noteworthy that we did not detect any changes in the internalization or endocytosis of full-length membrane APP in cells overexpressing ADAM30.

In conclusion, we hypothesize that ADAM30 is a key player in APP metabolism; it appears to be involved in APP degradation via sorting to lysosomes, targeted CTSD activation and then full-length APP recycling. The mechanisms that involve ADAM30 may restrict full-length APP recycling and therefore influence the pool of APP available for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase processing.

In conclusion, we characterized a new facet of the APP physiology which may provide new therapeutic targets to control amyloid peptide production in the brain.

Supplementary data to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.002>.

#### Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

#### Author contributions

F. Letronne, G.L., A-MA, J.C., A.F., E.D., F.E. and T.G. performed molecular and cellular biology experiments. G.L., A-MA, J.C., F.D., N.M., E.W. and F. Lafont performed/supervised cellular imaging. F. Letronne, A-MA, Y.S. performed mouse model breeding, brain preparation and soluble A $\beta$  measurements. G.L., A.B., F.H. performed Quantigene assays. M.L., K.G. performed COFRADIC experiments and interpretation. M.E.V., A-S.H., M.D., N.S. and T.D. performed 3D brain amyloid load analyses and interpretation. F. Leroux, J.D., B.D., R.D. developed and performed recombinant CTSD/ADAM30 assays. M.L. and D.T. performed Met experiments. L.H., Y.L., D.H. performed microarray experiments and interpretation. L.C., C.B., F.C. performed  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretase assays. F.P., C.B., J.-J.H., D.M. provided human brain samples for immunohistochemistry and

transcriptomic analyses. A-MA, J.C., M.E.V., A.B., P.D., C.D., B.D., F. Lafont, M.D., D.M., P.A., F.C., D.H., T.D., J.-C.L. participate to the writing and/or significantly revise the manuscript. A-MA, J.C., M.L., R.D., D.H., F.C., T.D., J.-C.L. conceived the experiments.

#### Acknowledgments

We thank the Lille Neurobank and UMR 1172 "Alzheimer & Tauopathies" for the brain immunohistochemistry experiments. We thank Florence Combes for her technical assistance. We thank Dr. Melissa Farinelli (E-Phy-Science) for her helpful discussion. F.L. was funded by the University of Lille II, the Nord-Pas de Calais Regional Council and the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM). G.L. and F.E. was funded by the Institute Pasteur de Lille and the Nord-Pas de Calais Regional Council. J.C. and Y.S. were funded by the MEDIALZ Project (Grant 11001003) financed by the European Regional Development Fund and the Nord-Pas de Calais Regional Council. F.H. was funded by the Alzheimer's Association (grant IIRG-06-25487) and then the Ligue contre la Maladie d'Alzheimer (LEOMA, grant 09705). C.D. was funded by Lille Métropole Communauté Urbaine. F.C. was supported by the Hospital University Federation (FHU OncoAge).

This work was also funded by the French government's CPER-Neuroscience (DN2M) program (Nord-Pas de Calais Regional Council and FEDER), INSERM (the ATC-vieillessement program), the Institut Pasteur de Lille, the Fondation pour la Recherche sur le Gerveau (FRC) and the French government's "Development of Innovative Strategies for a Transdisciplinary approach to Alzheimer's disease" Laboratory of Excellence (LABEX DISTALZ) program.

We acknowledge the support of Alzheimer's Research UK and Alzheimer's Society through their funding of the Manchester Brain Bank (from which samples were also obtained) under the Brains for Dementia Research (BDR) initiative.

#### References

- Almawi, W.Y., et al., 2013. A replication study of 19 GWAS-validated type 2 diabetes risk variants in the Lebanese population. *Diabetes Res. Clin. Pract.* 102, 117–122.
- Ando, Y., et al., 2015. Tumor Necrosis Factor (TNF)- $\alpha$  Induced Inhibition of GKAP2 Protein Levels through cGMP-dependent Kinase (CGK)-I $\alpha$  Causes Insulin Resistance in 3T3-L1 Adipocytes. *J. Biol. Chem.* 290, 5881–5892.
- Andreu, D., et al., 2008. BACE1- and BACE2-expressing human cells: characterization of  $\beta$ -amyloid precursor protein-derived catabolites, design of a novel fluorometric assay, and identification of new *in vitro* inhibitors. *J. Biol. Chem.* 278, 25859–25866.
- Barange, K., et al., 2016. MTS-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell. Mol. Life Sci.* 73, 217–235.
- Benes, P., Veselica, V., Fustik, M., 2008. Cathepsin D—many functions of one aspartic protease. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 68, 12–28.
- Benoist, F., et al., 2009. Evidence for induction of the ornithine decarboxylase expression in Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 14, 106–116.
- Canales, R.D., et al., 2006. Evaluation of DNA microarray results with quantitative gene expression platforms. *Nat. Biotechnol.* 24, 1115–1122 (Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16964225>).
- Carsan, J.A., Turner, A.J., 2002. Beta-amyloid catabolism: roles for neprilysin (NEP... *J. Neurochem.* 2002] - PubMed result. *J. Neurochem.* 81, 1–8 (Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12067222>).
- Cerretti, D.P., et al., 1999. Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261, 810–815.
- Chapuis, J., et al., 2009. Transcriptomic and genetic studies identify IL-33 as a candidate gene for Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 14, 1004–1016.
- Chevallier, N., et al., 1997. Cathepsin D displays *in vitro* beta-secretase-like specificity. *Brain Res.* 750, 11–19.
- Chhib, C., et al., 2006. BioVision: an application for the automated image analysis of histological sections. *Neurobiol. Aging* 27, 1462–1476.
- De Strooper, B., 2003. Aph-1, Pen-2, and nicastrin with presenilin generate an active  $\gamma$ -secretase complex. *Neuron* 38, 9–12.
- Delacourte, A., et al., 2002. Nonoverlapping but synergistic tau and APP pathologies in sporadic Alzheimer's disease. *Neurology* 59, 398–407.
- Dort, A.E., et al., 2008. High resolution three-dimensional brain atlas using an average magnetic resonance image of 40 adult C57Bl/6j mice. *NeuroImage* 42, 60–69.
- Dreyer, R.N., et al., 1994. Processing of the pro-beta-amyloid protein by cathepsin D is enhanced by a familial Alzheimer's disease mutation. *Eur. J. Biochem./FEBS* 224, 265–271.

- Dubois, A., et al., 2007. Automated three-dimensional analysis of histological and autoradiographic rat brain sections: application to an activation study. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 27, 1742–1755.
- Dubois, A., et al., 2010. Detection by voxel-wise statistical analysis of significant changes in regional cerebral glucose uptake in an APP/PS1 transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *NeuroImage* 51, 586–598.
- Ellis, K.L., et al., 2014. Genetic variation at glucose and insulin trait loci and response to glucose–insulin–potassium (GIK) therapy: the IMMEDIATE trial. *Pharmacogenomics* 15, 55–62.
- Fink, K.E., Kuret, J., 2012. Lysosomal fusion dysfunction as a unifying hypothesis for Alzheimer's disease pathology. *Int. J. Alzheimer's Dis.* <http://dx.doi.org/10.1155/2012/752894>.
- Gupta, V., et al., 2012. Association analysis of 31 common polymorphisms with type 2 diabetes and its related traits in Indian sib pairs. *Diabetologia* 55, 349–357.
- Haque, A., Banik, N.L., Ray, S.K., 2008. New insights into the roles of endolysosomal cathepsins in the pathogenesis of Alzheimer's disease: cathepsin inhibition as potential therapeutics. *ONS Neurol. Disord. Drug Targets* 7, 270–277.
- Hardy, J., Selkoe, D.J., 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 297, 353–357.
- Hinsby, A.M., Olsen, J.V., Mann, M., 2004. Tyrosine phosphorylation of fibroblast growth factor signaling: a role for insulin receptor substrate-4. *J. Biol. Chem.* 279, 46438–46447.
- Ho, M.M., et al., 2013. Diabetes genes identified by genome-wide association studies are regulated in mice by nutritional factors in metabolically relevant tissues and by glucose concentrations in islets. *BMC Genet.* 14, 10.
- Hu, C., et al., 2009. PPARG, KCNJ11, CDKAL1, CDKN2A-CDKN2B, IDE-KIF11-HHEX, IGF2BP2 and SLC30A8 are associated with type 2 diabetes in a Chinese population. *PLoS ONE* 4, 7648.
- Johanson-Wood, K., et al., 1997. Amyloid precursor protein processing and A beta42 deposition in a transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 1550–1555.
- Jonsson, T., et al., 2012. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488, 96–99.
- Kouchi, Z., et al., 1998. The deletion of the C-terminal tail and addition of an endoplasmic reticulum targeting signal to Alzheimer's amyloid precursor protein change its localization, secretion, and intracellular proteolysis. *Eur. J. Biochem.* 258, 291–300.
- Kouchi, Z., et al., 1999. Proteasome inhibitors induce the association of Alzheimer's amyloid precursor protein with Hsc70. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 254, 804–810.
- Kuhn, P.-H., et al., 2010. ADAMI0 is the physiologically relevant, constitutive  $\alpha$ -secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J.* 29, 3020–3032.
- Lai, A., Staudik, S.S., Trowbridge, L.S., 1995. Characterization of sorting signals in the  $\beta$ -amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J. Biol. Chem.* 270, 3565–3573.
- Lambert, J.C., Amouyel, P., 2011. Genetics of Alzheimer's disease: new evidence for an old hypothesis? *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 295–301.
- Lammich, S., et al., 1999. Constitutive and regulated  $\alpha$ -secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96, 3022–3027.
- Leberberg, J., et al., 2010. Validation of MRI-based 3D digital atlas registration with histological and autoradiographic volumes: an anatomofunctional transgenic mouse brain imaging study. *NeuroImage* 51, 1037–1046.
- Lee, J.H., et al., 2010. Lysosomal proteolysis and autophagy require presenilin 1 and are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell* 141, 1146–1158.
- LeFebvre, J., et al., 2012. Met degradation: more than one stone to shoot a receptor down. *FASEB J.* 26, 1387–1399.
- Liang, W.S., et al., 2008. Alzheimer's disease is associated with reduced expression of energy metabolism genes in posterior cingulate neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 4441–4446.
- Lorenzen, A., et al., 2010. Rapid and direct transport of cell surface APP to the lysosome defines a novel selective pathway. *Mol. Brain* 3, 11.
- Maday, E.A., et al., 1997. A possible role for cathepsins D, E, and B in the processing of beta-amyloid precursor protein in Alzheimer's disease. *Eur. J. Biochem.* 244, 414–425.
- Mucke, L., et al., 2000. High-level neuronal expression of a beta 1–42 in wild-type human amyloid protein precursor transgenic mice: synaptotoxicity without plaque formation. *J. Neurosci.* 20, 4050–4058.
- Nalbatroglu, J., et al., 1997. Impaired learning and LTP in mice expressing the carboxy terminus of the Alzheimer amyloid precursor protein. *Nature* 387, 500–505.
- Reitz, C., et al., 2010. Matrix metalloproteinase 3 haplotypes and plasma amyloid beta levels: the Rotterdam Study. *Neurobiol. Aging* 31, 715–718.
- Rosenberg, G.A., 2009. Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. *Lancet Neurol.* 8, 205–216.
- Schönher, C., et al., 2016. Generation of aggregation prone N-terminally truncated amyloid  $\beta$  peptides by neprilysin depends on the sequence specificity at the cleavage site. *Mol. Neurodegener.* 11, 19.
- Sevalle, J., et al., 2009. Pharmacological evidences for DRK167-sensitive presenilin-independent  $\gamma$ -secretase-like activity. *J. Neurochem.* 110, 275–283.
- Staes, A., et al., 2011. Selecting protein N-terminal peptides by combined fractional diagonal chromatography. *Nat. Protoc.* 6, 1130–1141.
- Tian, Y., et al., 2013. Adaptor complex AP2/PCALM, through interaction with LCB, targets Alzheimer's APP-CTF for terminal degradation via autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 110, 17071–17076.
- Tsien, J.Z., et al., 1996. Subregion- and cell type-restricted gene knockout in mouse brain. *Cell* 87, 1317–1326.
- Vandenbergh, M.E., et al., 2016. High-throughput 3D whole-brain quantitative histopathology in rodents. *Sci. Rep.* 6, 20958.
- Vincent, B., Checler, F., 2012.  $\alpha$ -Secretase in Alzheimer's disease and beyond: mechanistic, regulation and function in the shedding of membrane proteins. *Curr. Alzheimer Res.* 9, 140–156.
- Wang, D.S., Dickson, D.W., Maher, J.S., 2006. beta-Amyloid degradation and Alzheimer's disease. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006, 58405.
- White, A.R., et al., 2006. Degradation of the Alzheimer disease amyloid  $\beta$ -peptide by metal-dependent up-regulation of metalloprotease activity. *J. Biol. Chem.* 281, 17670–17680.
- Willm, M., et al., 2015.  $\gamma$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 526, 443–447.
- Yang, P., Baker, K.A., Hagg, T., 2006. The ADAMs family: coordinators of nervous system development, plasticity and repair. *Prog. Neurobiol.* 79, 73–94.
- Young, J.E., et al., 2015. Elucidating molecular phenotypes caused by the SORL1 Alzheimer's disease genetic risk factor using human induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* 16, 373–385.



## Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism

Julien Chapuis<sup>1</sup> · Amandine Flaig<sup>1</sup> · Benjamin Grenier-Boley<sup>1</sup> · Fanny Eysert<sup>1</sup> · Virginie Pottiez<sup>2,3</sup> · Gaspard Deloison<sup>2,3</sup> · Alexandre Vandeputte<sup>2,3</sup> · Anne-Marie Ayrat<sup>1</sup> · Tiago Mendes<sup>1</sup> · Shruti Desai<sup>1</sup> · Alison M. Goate<sup>4,5</sup> · John S. K. Kauwe<sup>6</sup> · Florence Leroux<sup>3</sup> · Adrien Herledan<sup>3</sup> · Florie Demiautte<sup>1</sup> · Charlotte Bauer<sup>7</sup> · Frédéric Checler<sup>7</sup> · Ronald C. Petersen<sup>8</sup> · Kaj Blennow<sup>9</sup> · Henrik Zetterberg<sup>9,10</sup> · Lennart Minthon<sup>11</sup> · Vivianna M. Van Deerlin<sup>12</sup> · Virginia Man-Yee Lee<sup>12</sup> · Leslie M. Shaw<sup>12</sup> · John Q. Trojanowski<sup>12</sup> · Marilyn Albert<sup>13</sup> · Abhay Moghekar<sup>13</sup> · Richard O'Brien<sup>14</sup> · Elaine R. Peskind<sup>15</sup> · Nicolas Malmanche<sup>1</sup> · Gerard D. Schellenberg<sup>16</sup> · Pierre Dourlen<sup>1</sup> · Ok-Ryul Song<sup>2</sup> · Carlos Cruchaga<sup>4,5</sup> · Philippe Amouyel<sup>1</sup> · Benoit Deprez<sup>3</sup> · Priscille Brodin<sup>2</sup> · Jean-Charles Lambert<sup>1</sup> · ADGC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative

Received: 19 October 2016 / Revised: 29 November 2016 / Accepted: 29 November 2016 / Published online: 8 December 2016  
© The Author(s) 2016. This article is published with open access at Springerlink.com

**Abstract** Genome-wide association studies (GWASs) have identified 19 susceptibility loci for Alzheimer's disease (AD). However, understanding how these genes are involved in the pathophysiology of AD is one of the main challenges of the "post-GWAS" era. At least 123 genes are located within the 19 susceptibility loci; hence,

a conventional approach (studying the genes one by one) would not be time- and cost-effective. We therefore developed a genome-wide, high-content siRNA screening approach and used it to assess the functional impact of gene under-expression on APP metabolism. We found that 832 genes modulated APP metabolism. Eight of these genes were located within AD susceptibility loci. Only FERMT2 (a  $\beta$ 3-integrin co-activator) was also significantly associated with a variation in cerebrospinal fluid A $\beta$  peptide

**Electronic supplementary material** The online version of this article (doi:10.1007/s00401-016-1652-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Julien Chapuis  
julien.chapuis@pasteur-lille.fr

<sup>1</sup> Laboratoire d'Excellence Distalz, Univ. Lille, Unité INSERM 1167, Institut Pasteur de Lille, BP 245, 1 rue du professeur Calmette, 59000 Lille cedex, France

<sup>2</sup> Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1019 - UMR 8204 - CIL - Center for Infection and Immunity of Lille, 59000 Lille, France

<sup>3</sup> Univ. Lille, INSERM, Institut Pasteur de Lille, U1177 - Drugs and Molecules for Living Systems, 59000 Lille, France

<sup>4</sup> Department of Psychiatry, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA

<sup>5</sup> Department of Neurology, Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, USA

<sup>6</sup> Departments of Biology and Neuroscience, Brigham Young University, Provo, USA

<sup>7</sup> Laboratoire d'Excellence DistALZ, Université Côte d'Azur, INSERM, CNRS, IPMC, France, 660 route des Lucioles, Sophia-Antipolis, 06560 Valbonne, France

<sup>8</sup> Department of Neurology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

<sup>9</sup> Clinical Neurochemistry Laboratory, Department of Neuroscience and Physiology, Sahlgren's University Hospital, Mölndal, Gothenburg, Sweden

<sup>10</sup> Department of Molecular Neuroscience, UCL Institute of Neurology, Queen Square, London, UK

<sup>11</sup> Clinical Memory Research Unit, Dept of Clinical Sciences, Lund University, Lund, Sweden

<sup>12</sup> Department of Pathology and Laboratory Medicine, Perelman School of Medicine at the University of Pennsylvania, Philadelphia, PA, USA

<sup>13</sup> Department of Neurology, Johns Hopkins University School of Medicine, Baltimore, MD, USA

<sup>14</sup> Department of Neurology, Duke Medical Center, Box 2900, Durham, NC 27710, USA

<sup>15</sup> Departments of Psychiatry and Behavioral Sciences, Veterans Affairs Northwest Network Mental Illness Research, Education, and Clinical Center, University of Washington School of Medicine, Seattle, USA



levels in 2886 AD cases. Lastly, we showed that the under-expression of FERMT2 increases A $\beta$  peptide production by raising levels of mature APP at the cell surface and facilitating its recycling. Taken as a whole, our data suggest that FERMT2 modulates the AD risk by regulating APP metabolism and A $\beta$  peptide production.

## Introduction

Alzheimer's disease (AD) is a progressive, neurodegenerative disorder. It is the leading cause of dementia worldwide. Memory loss and cognitive impairments are invariant, early signs of the AD, whereas hippocampal atrophy is one of the earliest histological hallmarks of the disease. Two main lesions are found in the AD brain: the neurofibrillary tangles formed by tau aggregation in neurons, and the senile plaques formed primarily by aggregated amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) peptides in the parenchyma. The identification of familial, AD-linked mutations in the genes for amyloid- $\beta$  precursor protein (APP) and presenilin (PS1 and PS2) associated with deregulation of A $\beta$  peptide production suggests that APP metabolism is at the heart of the disease process. This hypothesis was recently strengthened by the discovery of a rare APP mutation that lowered both A $\beta$  peptide production and the AD risk [12]. Lastly, consistent evidence also suggests that common genetic risk factors for late-onset AD (LOAD)—including the APOE gene—may be involved in A $\beta$  clearance in the brain [13]. Taken as a whole, these observations indicate that A $\beta$  production via the deregulation of APP metabolism should still be considered as a key pathogenic factor in AD.

Three main proteases ( $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases) are involved in APP processing through (1) the amyloidogenic pathway ( $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases), leading to A $\beta$  production, and (2) the non-amyloidogenic pathway ( $\alpha$ - and  $\gamma$ -secretase), which prevents A $\beta$  generation by cleaving APP within the A $\beta$  sequence [6]. Recently, new  $\delta$ - and  $\eta$ -secretase activities have been characterized [1, 26, 28], indicating that additional APP processing pathways may exist and may thus modulate A $\beta$  loads. In addition to secretase activities, APP trafficking in the secretory pathway and APP's fate are also essential factors in APP metabolism. APP matures in the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus and is then transported to the cell surface. Alternatively, APP can reach lysosomal compartments, where it undergoes proteolytic inactivation [15]. The equilibrium between these two compartments is driven by APP trafficking and maturation. O- and N-glycosylation are

prerequisites for making APP available to the secretases at the cell surface and in the endosomal system, and thus for A $\beta$  production. In this context, the various mechanisms that control APP trafficking are being intensively investigated. However, a large proportion of the key molecular players in APP trafficking have yet to be characterized.

Interestingly, new susceptibility loci for LOAD have been identified using genome-wide association studies (GWASs). One can reasonably assume that some of these genetic factors are involved in APP metabolism and A $\beta$  production. However, it is important to bear in mind that GWAS loci may contain several genes; hence, complex linkage disequilibrium patterns with the sentinel SNP in some of these loci may make it impossible to determine which gene is responsible for the observed signal. Indeed, there are 123 genes of interest within the 19 genomic risk regions identified in the International Genomics of Alzheimer's Project (IGAP) [9]. Even when a causative gene is eventually characterized, it is often difficult to establish a link with the pathophysiology of AD on the basis of literature data alone.

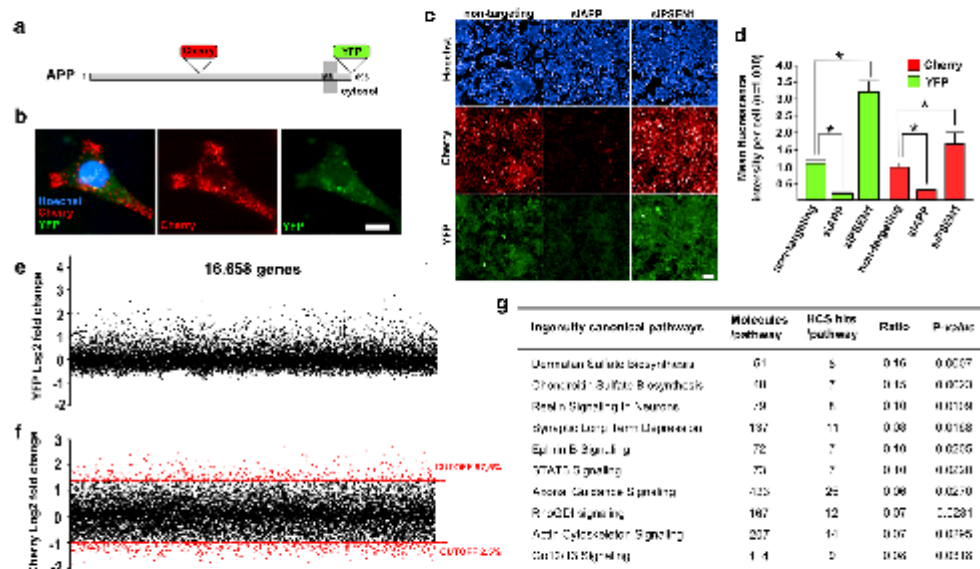
Given this context, we are seeking to develop novel, powerful approaches for empirically testing several GWAS-identified genes in cell-based or animal models. We therefore developed a genome-wide, high-content siRNA screening approach and used it to assess the functional impact of gene under-expression on APP metabolism.

## Methods

### HSC assay

We developed HEK293 cells line stably over-expressing a mCherry-APP<sup>695WT</sup>-YFP. The modified APP<sup>695WT</sup> protein is shown metabolized in the same way as APP<sup>695WT</sup> [21]. Custom, automatic image processing was used to determine the cell count and the mean fluorescence intensity per cell for both mCherry and YFP signals in cytoplasm. We tested the sensitivity of this model by measuring the modulation of intracellular APP fluorescence after treatment with proteasome inhibitor,  $\gamma$ -secretase inhibitor or transfection of siRNAs directed against APP and PSEN1 (Supplemental Fig 1 and Fig. 1c, d). These data demonstrated that both mCherry and YFP read-outs are markers of APP levels and APP processing. With an average of 1000 cells analyzed per well, 100% of test plates ( $n = 9$ ) were validated with a  $\beta$  score higher than 3 according to the HCS guideline [2] (Supplemental Fig. 1).

<sup>16</sup> Stellar-Chance Laboratories, Perelman School of Medicine, University of Pennsylvania, Philadelphia, USA



**Fig. 1** Genome-wide high-content siRNA screening identifies modulators of APP metabolism. **a** Schematic representation of APP, showing the point in the sequence at which the fluorescent proteins (cherry and YFP) were inserted. **b** Representative fluorescence microscopy images, showing HEK293 cells transfected with double-tagged APP (cherry-APP-YFP) and stained with Hoechst reagent. Scale bar 10  $\mu$ m. **c** Representative fluorescence microscopy images showing the impact of siRNA transfection (non-targeting, siAPP or siPSEN1) on the mCherry and YFP intensities. Scale bar 100  $\mu$ m. **d** Quantification of the relative mean fluorescence intensity of mCherry

and YFP signals per cell after siRNA transfection. Histograms indicate the mean  $\pm$  SD values. \* $p < 0.05$ , non-parametric test. **e** Mean fluorescence intensity variations (log<sub>2</sub> fold-change) of the YFP signal obtained after genome-wide siRNA screening in triplicate. **f** Mean fluorescence intensity variations (log<sub>2</sub> fold-change) of the mCherry signal obtained after genome-wide siRNA screening in triplicate. The mCherry signal was used to determine the 5% hits exhibiting the strongest variations (in red; 2.5% showing an upregulation and 2.5% showing a downregulation). **g** The best 10 canonical-pathways identified after pathway enrichment analysis using IPA

### Genome-wide, high-content siRNA screening

The SiGENOME SMARTpool siRNA library (targeting the 18,107 genes of the whole human genome) was screened in HEK293 cells stably over-expressing a mCherry-APP<sup>695wt</sup>-YFP. Briefly, 50 nl of 10  $\mu$ M solutions of each siRNA were first transferred to 384-well microtiter plates using an Echo 555 liquid handler. Next, 10  $\mu$ l of D-PBS containing 0.1  $\mu$ l of lipofectamine<sup>TM</sup> RNAiMax were then distributed using a BioTEK EL406 Washer Dispenser. After a 30-min incubation at room temperature (enabling the transfectant complex reaction), 40  $\mu$ l of HEK293-mCherry-APP<sup>695wt</sup>-YFP cells were distributed onto the plates using a BioTEK EL406 Washer Dispenser, in order to obtain a final density of 3000 cells per well. The microplates were incubated for 3 days at 37  $^{\circ}$ C. The cells were then incubated with 5  $\mu$ g/ml of Hoechst 33,342 at 37  $^{\circ}$ C with 5% CO<sub>2</sub> (v/v) for 30 min. After removal of the cell medium, 10% formalin was added to each well and plates were incubated at room temperature

for 30 min for staining and cell fixation. Lastly, the cells were stored in D-PBS, and images were acquired at 405, 488 and 561 nm with an InCell Analyser 6000 high-resolution automated confocal microscope. One field per well was read from the B1 well to the O24 well in a horizontal, serpentine acquisition mode with a 20 $\times$  objective.

### HCS quantification and analysis

Customized image analysis software (Columbus 2.7, PerkinElmer) was used for the image analysis and the quantification. Hoechst staining was used for the segmentation of both nuclei and cell. Next, the mean fluorescence intensity of each mCherry and YFP signals in the cytoplasm were quantified. The mean fluorescence intensity of each signals were then normalized to the fold-change based on the non-targeting siRNA in the same plate. To evaluate the impact of each siRNA, an average of 1000 cells was analyzed per run ( $n = 3$ ). For the quality control of HTS, we used strictly

standardized mean difference with more than 3 of beta-score of two positive control (siRNA-APP and siRNA-PS1,  $n = 14$  each per plate) (Supplemental Fig. 1).

### Pathway analysis

Ingenuity Pathway Analysis (IPA; Ingenuity Systems/Qiagen, Redwood City, USA) was used to map lists of significant genes to gene ontology groups and biological pathways. An Ingenuity 'core analysis' based on the Ingenuity Pathway Knowledge Base (gene only) was performed (2015 release) considering only molecules and/or relationships experimentally observed (direct and indirect relationships) in human (stringent filter).

### CSF biomarker datasets

CSF samples were obtained from the Knight-ADRC ( $N = 893$ ), ADNI ( $N = 394$ , the Biomarkers for Older Controls at Risk for Dementia (BIOCARD) ( $N = 182$ ), Mayo Clinic ( $N = 433$ ), Lund University (Swedish) ( $N = 293$ ), University of Pennsylvania (Penn) ( $N = 164$ ), University of Washington ( $N = 375$ ).

Cases were diagnosed with dementia of the Alzheimer's type (DAT) according to the NINCDS-ADRDA. Control individuals were evaluated using the same criteria and showed no symptoms of cognitive impairment. All participants provided written informed consent and the ethics committee approved the informed consent procedure (IRB ID #: 201105364). 787 additional samples with biomarker data used in the analyses were obtained from the ADNI database (adni.loni.usc.edu). CSF in all studies was collected in a standardized manner. Briefly, CSF (20–35 ml) was collected at 8:00 AM after overnight fasting, as described previously [10, 11]. LPs (L4/L5) were performed by a trained neurologist using a 22-gauge Sprotte spinal needle. Samples were gently inverted to avoid gradient effects, briefly centrifuged at low speed to pellet any cellular elements, and aliquoted (500  $\mu$ l) into polypropylene tubes before freezing at  $-84$  °C. Biomarker measurements within each study were conducted using internal standards and controls to achieve consistency and reliability. However, differences in the measured values between studies were observed which are likely due to differences in the antibodies and technologies used for quantification (standard ELISA with Innotech for Knight-ADRC, UW, Swedish, German, and Mayo versus Luminex with AlzBio3 for ADNI-1, ADNI-2, BIOCARD and Penn), ascertainment and/or handling of the CSF after collection. CSF A $\beta$ 42 and ptau181 values were log transformed in order to approximate a normal distribution. Because the CSF biomarker values were measured using two different platforms (standard ELISA with Innotech and Luminex with AlzBio3), we

did not combine the raw data. For the combined analyses, we standardized the mean of the log-transformed values from each dataset to zero. No significant differences in the transformed and standardized CSF values were found between cohorts. We also performed meta-analyses for the most significant SNPs by combining the P values for each independent dataset using METAL. No major differences were found between the joint-analyses and the meta-analyses.

### Cell culture, transfections, and Western blotting (WB)

HEK293 cell lines were maintained in 1:1 DMEM F12/Opti-MEM supplemented with 10% fetal bovine serum, penicillin, and streptomycin at 37 °C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. Prior to transfection, cells were plated at a density of ~70%. transient transfection of FERMT2 cDNA (cloned into a pcDNA4 vector; GeneArt) was performed using Fugene HD (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. For WB, cells were washed with PBS and solubilized in ice-cold lysis buffer (Tris 1 M pH 7.4; NaCl 1.5 M; Nonidet P-40 0.1%; SDS 10%; sodium orthovanadate 100 mM; sodium deoxycholate 0.5%; 1 $\times$  complete protease inhibitor mixture, Roche Applied Sciences). Cell extracts (5–20  $\mu$ g) were analyzed using SDS-PAGE and the antibodies listed. For WB and immunofluorescence analysis, the following antibodies were used: hFERMT2 (GTX84507, GeneTex), amyloid precursor protein C-Terminal (A8717, Sigma), actin (A2066, Sigma),  $\beta$ -amyloid 6E10 (SIG-39320, Biogen), ATPase (Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>) alpha subunit (a5, DSHB), Rab4 (PA3-912, Thermo Scientific Pierce), Alzheimer precursor protein A4 clone 22C11 (MAB348, Millipore). For siRNA transfection, we used Dharmacon siRNA, non-targeting (D0018100105) and siFerm2 (J01275305, J01275306, J01276307, J01275308 and L01275300). Secreted A $\beta$  and sAPP fragments were analyzed with an AlphaLISA, as described previously [15].

### Primary neuronal cultures

Primary mixed cortical and hippocampal neuronal cultures were obtained from P0 rats, according to previously described procedures [16]. Briefly, hippocampi and cortices were isolated from newborn rats, and neurons were dissociated by trypsin digestion. Neurons were plated on poly-L-lysine-coated coverslips or six-well plates, and were incubated with minimal essential medium (MEM) supplemented with 10% fetal bovine serum, Glutamax, MEM vitamins and penicillin/streptomycin (Life Technologies), according to the manufacturer's instructions. After 24 h, neurons were transferred into serum-free Neurobasal-A medium supplemented with B27 (Gibco, Life



Technologies), Glutamax and uridine-deoxyfluorouridine for 14 days of in vitro culture. Lentivirus transductions were performed (MOI = 4) used Mission shRNA vectors (Sigma), non-targeting (05191520MN) and shFermt2 (TRCN0000191859).

### Immunofluorescence

The immunofluorescence procedure has been described previously [5]. In brief, cells were washed with PBS, fixed in PBS containing 4% paraformaldehyde for 20 min at room temperature, and then permeabilized with 0.25% (v/v) Triton X-100 in PBS for 10 min. After blocking in 1% (w/v) bovine serum albumin (BSA), cells were incubated for 2 h at room temperature with primary antibodies diluted 1/100 in PBS 1% BSA. The cells were then washed 3 times with PBS. Appropriate secondary antibodies (diluted 1/400) were applied. After washing, coverslips were mounted on slides.

For the APP internalization assay, cells were incubated with 6E10 antibody for 1 h at 4 °C in ice-cold Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 1% (w/v) bovine serum albumin and then washed and incubated at 37 °C for the times indicated. Cells were fixed as described above.

### Cell surface biotinylation

HEK293-APP695<sup>WT</sup> cells or primary neuronal cultures were transfected in 100 mm dishes. After 48 h of transfection, cell surface proteins were biotinylated using sulfo-NHS-SS-biotin, as per the supplier's recommendations (Cell Surface Protein Isolation Kit, Pierce). Briefly, cells were incubated with cold PBS containing sulfo-NHS-SS-biotin for 30 min at 4 °C, with gentle rocking. Cells were then lysed and immunoprecipitated with streptavidin beads. Precipitated proteins were eluted from the avidin beads with loading buffer containing 50 mM DTT, heated for 5 min at 95 °C, and analyzed by WB.

### Statistical analysis

The robustness of the replicates between the 3 screens was assessed using the standard deviation (SD). In average, the SD was of 11.5% ( $\pm 7.3\%$ ) for the 16,658 genes and 12.4% ( $\pm 8.1\%$ ) for the 832 hits. Only 661 genes exhibited experiments with an SD superior of 25% for the 16,658 genes (54 in the 832 list). Associations between the CSF A $\beta$ 42 level and the genetic variants were analyzed as previously reported [7]. Our analysis included a total of 5,815,690 imputed and genotyped variants. We used Plink to analyze the SNPs' associations with CSF biomarker levels. Age, gender, site, and the three principal component factors for the population structure were included as covariates.

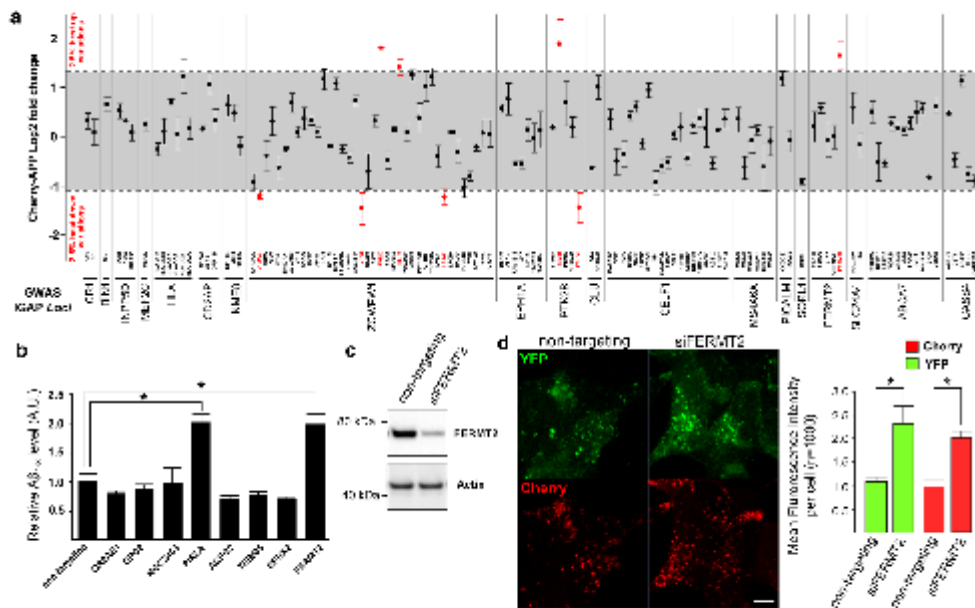
## Results

### Systematic high-content screening for genes that modulate APP metabolism

To identify modulators of APP metabolism, we developed a cell-based, high-content assay for the rapid detection and quantification of intracellular APP fragments in HEK293 cells stably over-expressing a mCherry-APP695<sup>WT</sup>-YFP (Fig. 1a, b, Supplemental Fig. 1). After customization for automatic image processing, we screened a genome-wide bank of 18,107 human siRNAs (SMARTpool) by analyzing the impact of transfection in our HEK293 model (in a 384-well plate format). For quality control procedures, the siRNA-PSEN1 and siRNA-APP (Fig. 1c, d) were used to calculate the strictly standardized mean difference (denoted as  $\beta$  in Supplemental Fig. 1). The complete screen was performed in triplicate, and only plates with  $\beta > 3$  were analyzed (98.5% as recommended in high-content screening (HCS) guidelines [2]). This procedure led us to select 17,354 siRNAs. Furthermore, experiments in which less than 300 cells per well were analyzable were excluded (mean  $\pm$  standard deviation cell count per well for the whole HCS experiment:  $795 \pm 345$ ). The impact of 16,653 siRNA transfections on APP metabolism was then assessed, and the mean variation in both mCherry and YFP signals was normalized against the fluorescence intensity of non-targeting siRNA. It is noteworthy that transfection of siRNA targeting genes already known to modulate APP metabolism (*ADAM10*, *PSEN1*, *BACE1* and *SORL1*) showed significant variations for mCherry and YFP signals, compared with non-targeting siRNA (Supplemental Fig. 2).

Because YFP fluorescence is detected weakly, due to its rapid turnover at the membrane [21], it limited the detection of a down-variation for this signal (Fig. 1e). Thus, we decided to focus on the mCherry signal as the main read-out for selecting the 5% of hits showing the strongest variations (2.5% upregulated and 2.5% down-regulated) (Fig. 1f). In all, 832 hits with a potential impact on APP metabolism were selected (Fig. 1f; Supplemental Table 1). In average, the standard deviation was of 12.4% ( $\pm 8.1\%$ ) for the 832 hits.

Starting from this list of genes, we investigated potential protein–protein interaction networks by using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software (<http://www.ingenuity.com/products/ipa>). This hypothesis-free approach described a complex interactive network that was primarily centered on APP (Supplemental Fig. 3). APP was the protein with the highest number of interactions with other proteins in the network—indicating that our HCS approach efficiently detected proteins known to interact with APP. Gene enrichment analysis (using IPA) of the 832 hits identified 10 significantly over-represented pathways; notably,



**Fig. 2** Cross-correlations between HCS and GWAS data. **a** Mean variations in mCherry fluorescence intensity after the silencing of genes associated with the AD risk in the IGAP's meta-analysis. Eight genes (*in red*) were included in the best 5% variations, based on the HCS data. **b** Impact of the silencing of the 8 hits on the  $A\beta_{1-x}$  secretion level in the medium of the HEK293-mCherry-APP-YFP

cell line. Histograms indicate mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , non-parametric test. **c** Validation of FERMT2 silencing after transfection with the siRNA-FERMT2 SMARTpool used in HCS. **d** Representative fluorescence microscopy images and quantification showing the impact of FERMT2 silencing on mCherry and YFP intensity based on HCS data. Scale bar 10  $\mu$ m

dermatan and chondroitin sulfate biosynthesis ( $p = 0.0007$ ) is involved in the composition of the extracellular matrix and the glycosylation of proteins like APP (Fig. 1g). All the other pathways were signaling pathways mainly involving integrin, paxillin or receptor tyrosine kinase signaling (Supplemental Fig. 4). These pathways (axogenesis; neuron and neurite development; cell-cell junction maintenance; cell morphogenesis and projection; and integrin-mediated signaling) have been already implicated in the modulation of  $A\beta$  secretion [3].

#### Identification of FERMT2 as a genetic risk factor that modulates APP metabolism

We used HCS data to investigate the function of the genes within the LOAD risk loci recently reported in the IGAP's meta-analysis of GWASs [14]. Of the 123 known genes reaching genome-wide significance, 8 were included in the top 5% of hits: *OR2AE1*, *GPC2*, *PVRIG*, *PIRLA*, *AGFG2*, *TRIM35*, *EPHX2* and *FERMT2* (Fig. 2a) suggesting that these genes could be involved in the AD process via the

regulation of APP metabolism. However, only *PIRLA* and *FERMT2* showed an effect on the  $A\beta_{1-x}$  secretion in HEK293-mCherry-APP<sup>695wt</sup>-YFP (Fig. 2b). Lastly, to assess the potential impact of these genes on  $A\beta$  peptide levels in humans, we measured the association between SNPs in these 8 genes and cerebrospinal fluid (CSF)  $A\beta_{42}$  peptide levels in a large sample ( $n = 2886$ ) of AD cases [7]. After gene-wide correction (Bonferroni,  $p < 0.006$ ), we found that only SNPs within *FERMT2* were associated with low  $A\beta_{42}$  peptide levels ( $p = 0.0006$ ; Table 1).

Of note, according to the RNA-Seq transcriptome and splicing database ([http://web.stanford.edu/group/barres\\_lab/brain\\_maseq.html](http://web.stanford.edu/group/barres_lab/brain_maseq.html)), *FERMT2* (but not *PIRLA*) is expressed in neurons which are the main sources of  $A\beta$  in the brain. Similar results were observed in another database focusing on hippocampal neurons (<http://hipposeq.janelia.org/>; data not shown).

All together, these observations highlighted the potential role of *FERMT2* in the AD process via the modulation of APP metabolism and  $A\beta$  peptide generation. We first validated the silencing of *FERMT2* after transfection

**Table 1** The associations between the eight genes located in IGAP loci and the CSF A $\beta$ 42 concentration ( $n = 2886$  AD cases)

| Chr. | IGAP locus    | Gene           | Modulators of APP metabolism in IGAP loci |                          | Association with the CSF A $\beta$ 42 level* |               |               |
|------|---------------|----------------|---|--------------------------|--|---------------|---------------|
|      |               |                | GFP log2 fold-change                      | mCherry log2 fold-change | SNP  | $\beta$ score | $p$ value     |
| 7    | <i>ZCWPW1</i> | <i>OR2AE1</i>  | -0.58 $\pm$ 0.05                          | -1.18 $\pm$ 0.07         | rs35649099                                   | -0.01422      | 0.2026        |
|      |               | <i>GPC2</i>    | -0.68 $\pm$ 0.09                          | -1.45 $\pm$ 0.32         | rs12705074                                   | -0.01702      | 0.0384        |
|      |               | <i>MGC2463</i> | 1.29 $\pm$ 0.04                           | 1.83 $\pm$ 0.02          | rs150436753                                  | 0.01965       | 0.1215        |
|      |               | <i>PILRA</i>   | 1.17 $\pm$ 0.10                           | 1.43 $\pm$ 0.16          | rs28714213                                   | 0.01737       | 0.0171        |
|      |               | <i>AGFG2</i>   | -0.34 $\pm$ 0.05                          | -1.21 $\pm$ 0.16         | rs78951820                                   | -0.03433      | 0.0247        |
| 8    | <i>PTK2B</i>  | <i>TRIM35</i>  | 1.84 $\pm$ 0.30                           | 1.91 $\pm$ 0.50          | rs77389621                                   | -0.02716      | 0.0584        |
|      |               | <i>EPHX2</i>   | -0.46 $\pm$ 0.08                          | -1.42 $\pm$ 0.30         | rs7341557                                    | 0.02001       | 0.0160        |
| 14   | <i>FERMT2</i> | <i>FERMT2</i>  | 1.19 $\pm$ 0.34                           | 1.67 $\pm$ 0.28          | rs62003531                                   | -0.02745      | <b>0.0006</b> |

Bold represents significance after correction for multiple testing

\* Linear regression, adjusted for age and gender

of the SMARTpool siRNA library used for HCS (Fig. 2c). FERMT2 knock-down was associated with the accumulation of both mCherry and YFP signals (Fig. 2d). Thus, we decided to focus on characterizing the impact of FERMT2 on APP metabolism in cell-based models.

#### FERMT2 modulates APP processing and metabolite secretion

To rule out a potential off-target effect of the siRNA-FERMT2 SMARTpool used for HCS (four different siRNAs), we first validated the mCherry and YFP signal variations associated with FERMT2 silencing by assessing the effect of each siRNA-FERMT2 independently ( $n = 4$ ). Three siRNA-FERMT2 were associated with an increase in both mCherry and YFP signals, which was consistent with the effect observed when using the siRNA pool (Supplemental Fig. 5).

To further evaluate the impact of FERMT2 silencing on APP metabolism, we quantified mature and immature forms of APP and the various metabolites of APP. In the HEK293 cell line stably over-expressing APP<sup>695WT</sup> (HEK293-APP<sup>695WT</sup>), we observed that a strong increase in mature APP levels was associated with the accumulation of all the APP-derived substrates for  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases (C83 and C99 intracellular C-terminal fragments of APP produced, respectively, by  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretases, as well as APP $\alpha$ , sAPP $\beta$  and A $\beta$  secretions) (Fig. 3a). Again, similar results were obtained using different siRNA-FERMT2 sequences (Supplemental Fig. 6).

Next, we assessed the impact of FERMT2 silencing on endogenous APP metabolism in HEK293. As observed in HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells, FERMT2 silencing resulted in a significant increase in mature APP levels (Fig. 3b). It is noteworthy that mature APP levels also rose

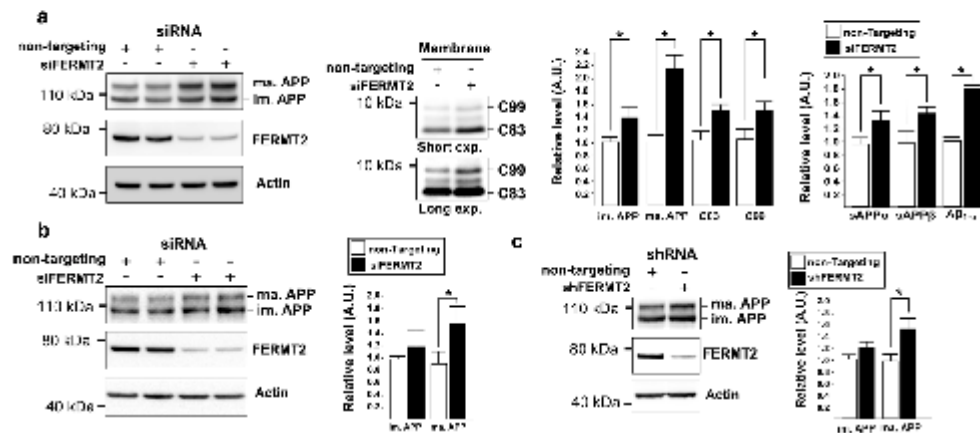
after transfection of siRNA-FERMT2 into the HEK293-mCherry-APP<sup>695WT</sup>-YFP cell line (Supplemental Fig. 7)—showing that the mechanisms were consistent in our cell models expressing APP<sup>695WT</sup> in the presence or absence of mCherry and YFP tags.

Lastly, we confirmed the increase in neuron levels of mature APP after lentiviral transduction with shRNA against FERMT2 in a primary neuronal culture (PNC) endogenously expressing APP (Fig. 3c). Taken as a whole, these results show that FERMT2 silencing (using either siRNA or shRNA) controls the mature APP levels in various models overexpressing (or not) APP.

#### FERMT2 expression controls cell surface levels of APP

A large body of evidence suggests that APP is mainly cleaved by secretases at or near the plasma membrane. Since FERMT2 silencing reportedly increases the amount of CD39 and CD73 at the cell surface [18], we looked at whether FERMT2 can interfere with mature APP levels by promoting APP trafficking to the cell surface. If so, this would be consistent with our previous observation in which FERMT2 silencing appeared to be associated with a general increase in mature APP levels, but did not change immature APP levels in total cell extracts. We addressed this hypothesis more specifically by performing extracellular biotinylation experiments; these revealed that FERMT2 silencing strongly increased mature APP levels at the cell surface in HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells (Fig. 4a). Conversely, the over-expression of FERMT2 was associated with low mature APP levels at the cell surface (Fig. 4b). This observation was validated in HEK293 and PNCs (both of which endogenously expressed APP): FERMT2 silencing was systematically associated with more abundant mature APP in cell-surface-biotinylated fractions (Fig. S7 and Fig. 4c, respectively).





**Fig. 3** Characterization of the impact of FERMT2 on APP metabolism. **a** Impact of FERMT2 silencing on APP metabolism in the HEK293-APP<sup>695WT</sup> cell line. Cells transiently transfected with siFERMT2 or non-targeting siRNA were analyzed by WB using anti-APP C-terminal, anti-FERMT2 or anti-actin antibodies. sAPP $\alpha$ , sAPP $\beta$  and A $\beta$ <sub>1-42</sub> secreted into conditioned medium were assayed using an AlphaLISA. ma. APP, mature APP; im. APP, immature APP

Densitometric analyses and WB quantifications from three independent experiments are shown. Histograms indicate the mean  $\pm$  SD. a.u., arbitrary units. \* $p < 0.05$ , non-parametric test. **b** Impact of FERMT2 silencing on the mature APP levels in HEK293 cells endogenously expressing APP. **c** Quantification of mature and immature APP levels after lentiviral transduction with shRNA against FERMT2 in a primary neuronal culture endogenously expressing APP

### FERMT2 silencing inhibits APP degradation and promotes APP recycling at the plasma membrane

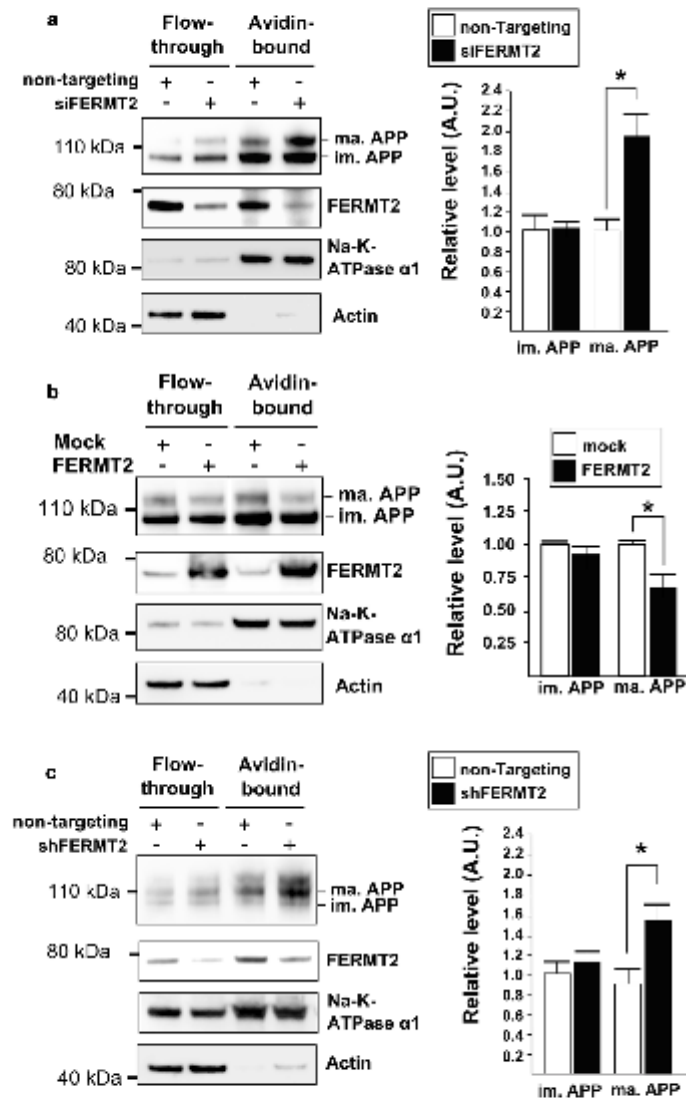
Since FERMT2 silencing reportedly enhances cell-surface CD39/CD73 levels by promoting their recycling to the plasma membrane [18], we also looked at whether FERMT2 has a similar effect on APP. To this end, we first explored the time course of APP degradation by using the alkalinizing drug bafilomycin A1 (BafA1) to block transport from late endosomes to lysosomes. We found that siFERMT2 significantly lowered the accumulation of mature APP upon BafA1 treatment (Fig. 5a)—suggesting that FERMT2 silencing may lead to a reduction in APP degradation by lysosomes.

We next assessed the impact of FERMT2 silencing on APP internalization. After incubation of HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells with 6E10 antibody at 4 °C, the time course of 6E10-APP complex endocytosis was monitored via immunofluorescence (Fig. 5b, c). After 20 min at 37 °C, APP was rapidly internalized into small vesicles at all levels of FERMT2 expression. Although internalization was unaffected, the remaining APP staining in vesicles was more intense in cells under-expressing FERMT2 than in control cells (respectively,  $47 \pm 16$  versus  $19 \pm 9\%$  of the initial APP staining observed at the cell surface before

internalization). A similar observation was made at 40 min ( $32 \pm 9$  and  $13 \pm 7\%$ , respectively). These data suggest that FERMT2 lowered lysosomal degradation of APP by favoring the recycling route and thus boosting cell surface levels of APP. Inhibition of  $\beta$ 3-integrin reportedly promotes the activation of a RAB4-regulated pathway that (for example) diverts receptor tyrosine kinases (such as the VEGFR) from the degradative route back to the plasma membrane [4]. In order to establish whether a similar mechanism was operating for APP, we measured the effect of FERMT2 silencing on the APP recycling rate (i.e., the proportion of internalized APP colocalized with Rab4). We observed an increase in the proportion of Rab4+/APP+ endosomes; this indicated the induction of the APP recycling and was concordant with the above-mentioned accumulation of APP at the cell surface (Fig. 5d, e). Importantly, Rab4 expression did not change after siRNA-FERMT2 transfection. Lastly, we found that co-transfection of siRNA-FERMT2 with Rab4A-specific siRNA abolished the accumulation of mature APP (Fig. 5f). These data show that Rab4A is required for the induction of APP recycling after FERMT2 silencing. Taken as a whole, our results suggest that by facilitating APP recycling after endocytosis, FERMT2 controls the pool of mature APP available for cleavage by  $\alpha$ -,  $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases.



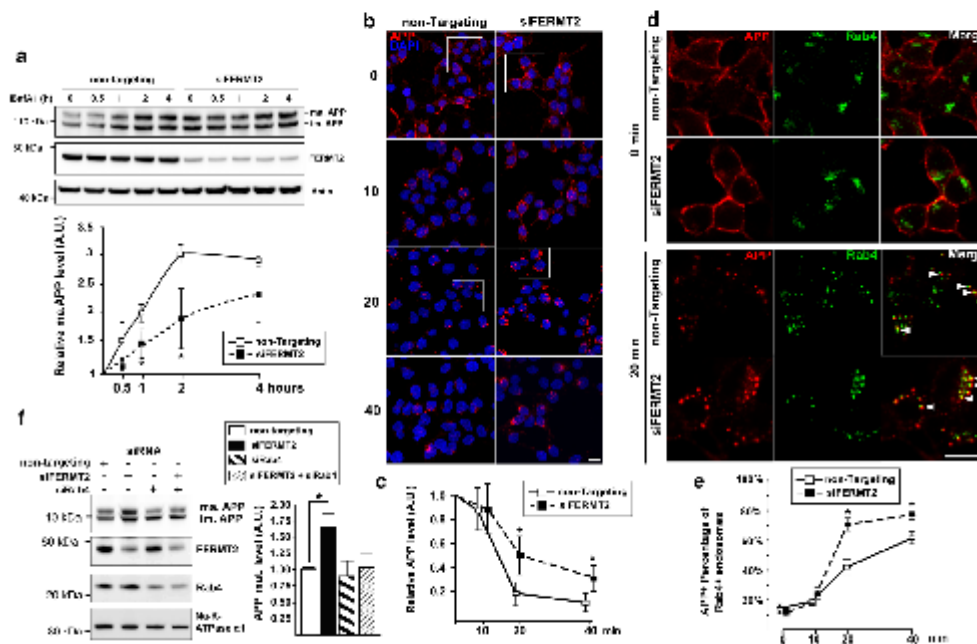
**Fig. 4** FERMT2 expression controls the cell surface level of mature APP. **a** Cell-surface-biotinylated proteins from HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells transiently transfected with siFERMT2 or non-targeting siRNA. Cell extracts were precipitated with immobilized avidin and analyzed by WB using antibodies against APP, FERMT2, actin (an intracellular marker), and Na-K-ATPase  $\alpha$ 1 (a cell surface marker). ma. APP, mature APP; im. APP, immature APP. Densitometric analyses and WB quantifications from three independent experiments are shown. Histograms indicate the mean  $\pm$  SD. a.u., arbitrary units. \* $p < 0.05$ , non-parametric test. **b** Cell-surface-biotinylated proteins from HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells transiently transfected with FERMT2 cDNA or empty vector (Mock). **c** Cell-surface-biotinylated proteins from primary neuronal culture after lentiviral transduction with shRNA against FERMT2 or non-targeting shRNA



## Discussion

One can legitimately hypothesize that at least some of the genetic risk factors identified in GWASs have a role in APP metabolism and A $\beta$  production. However, APP metabolism is a complex process and the underlying mechanisms have not been fully characterized yet. Literature data on these

risk factors provide indirect clues but clearly cannot ascribe these genes with a genuine impact at a particular step in the pathophysiology of APP processing. Furthermore, a conventional gene-by-gene cell biology approach did not appear to be time- or cost-effective for investigating the 123 genes located within the GWAS-defined susceptibility loci. Hence, we developed an HCS assay for empirically



**Fig. 5** FERMT2 silencing inhibits APP degradation and promotes APP recycling at the plasma membrane. **a** HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells transiently transfected with siFERMT2 or non-targeting siRNA were treated with bafilomycin A1 (BafA1, 50 nM) for the indicated times. Cell extracts were then analyzed by WB. Densitometric analyses and mature APP levels for three independent experiments are shown. Graphs indicate the mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , non-parametric test. **b** The time course of APP endocytosis and degradation was indirectly visualized by internalization of 6E10 antibody. Cells were incubated with 6E10 antibody at 4 °C for 1 h. The temperature was then shifted to 37 °C, and cells were processed for immunofluorescence at the

indicated times. Scale bar 10  $\mu$ m. **c** Relative fluorescence intensity from 6E10 staining, showing the time course of APP degradation. **d** A zoom-in (the square in **b**) for the indicated times (0 and 20 min at 37 °C). Co-staining with anti-Rab4 antibody was used to visualize the APP within Rab4-positive endosomes involving in recycling. **e** Co-localization of 6E10 staining with Rab4 staining, as a guide to the APP level within recycling endosomes at the indicated times. **f** Cells transiently transfected with anti-FERMT2 in the presence or absence of siRab4. Extracts were analyzed by WB using anti-APP C-terminal, anti-FERMT2, anti-Rab4 or anti-actin antibodies

testing multiple GWAS-identified genes and identifying modulators of APP metabolism.

Our genome-wide siRNA screening gave us an overview of the different factors likely to affect APP metabolism and thus enabled us to select the most significant APP modulators (i.e., the 5% throughout the genome showing the strongest variations). From among a total of 832 modulators, we identified 8 genes associated with the AD risk in the largest yet GWAS meta-analysis (the IGAP). Importantly, our approach is not fully exhaustive and it is impossible to exclude that genes involved in APP metabolism are localized outside of the peak defined by the GWAS but regulated by SNP associated with AD risk. Similarly, focusing on the 5% strongest variations may lead to exclude some genes of interest. For instance, although SORL1 was not included in the 832 best hits, under-expression of this gene

had significant impact on mCherry and YFP signals when compared with non-targeting siRNA. Moreover, SNPs localized within *SORL1* showed an association with the CSF A $\beta$ 42 level ( $p = 0.007$ ).

To validate the potential impact of these genes on APP metabolism in vivo, we assessed the association between SNPs in these genes and the CSF A $\beta$ 42 level in 2886 AD cases. Only FERMT2 was associated with significantly low levels of A $\beta$ 42 ( $p = 0.0006$ ) after correction for multiple testing. The SNP rs62003531 most strongly associated with the A $\beta$ 42 level was in strong linkage disequilibrium ( $r^2 = 0.77$ ) with the sentinel SNP rs17125944 (found to be associated with the AD risk in the IGAP's GWAS meta-analysis). It is noteworthy that this sentinel polymorphism was also associated with A $\beta$ 42 levels ( $p = 0.03$ )—suggesting that both these SNPs represent the same genetic signal.

Taken as a whole, these data indicate that FERMT2 regulates APP metabolism in general and A $\beta$  loads in particular. Accordingly, we observed that FERMT2 silencing led to an increase in mature APP levels and A $\beta$  secretion. Since we also observed that APP recycling was promoted by FERMT2 silencing through Rab4A-positive endosomes, our data strongly suggest that FERMT2 regulates APP recycling and its presence at the cell surface. The extracellular domain of APP is reportedly involved in cell–matrix adhesion and facilitates cell–cell adhesion via transcellular interactions [17]. Interaction between APP and integrin is required for adequate neurite outgrowth and contact guidance [24, 27]. Moreover, abnormal cleavage of APP might impair the protein's functions in cell adhesion and migration [22]. Hence, the regulation of cell adhesion may be important in APP metabolism. Furthermore, FERMT2 expression is required for cell adhesion; recruitment of the focal adhesion kinase FAK and p130CAS is required for  $\beta$ 3 integrin signaling [19, 25]. Several lines of evidence have established that integrin signaling controls the trafficking of other receptors and cargos [4]. For instance, inhibition of  $\beta$ 3-integrin might promote the activation of a Rab4-regulated pathway that (for example) diverts receptor tyrosine kinases (such as the VEGFR) from their degradation route back to the plasma membrane [20]. These data suggest that FERMT2 has an integrin-dependent impact on mature APP levels via a similar mechanism. It is noteworthy that some of the main regulators of integrin signaling (e.g.,  $\beta$ 3-integrin, Src, paxillin and p130Cas) were also identified as modulators of APP metabolism in our HCS analysis (Supplemental Fig. 4).

Although FERMT2 expression appears to control cell surface levels of APP (which might modulate cell adhesion), our data also indicate that a FERMT2 under-expression may favor A $\beta$  production. Interestingly, by using another independent, systematic approach, we have already suggested that low FERMT2 expression might contribute to the development of AD [8]. We reported that the rs7143400-T allele (associated with an increase in the AD risk and located within the FERMT2 3' untranslated region [3'-UTR]) creates a perfect seed for miR-4504. Co-transfection of the rs7143400-T allele and miR-4504 resulted in lower luciferase activity (relative to the rs7143400-G allele co-transfected with the same miRNA). This observation indicated that a functional SNP within the FERMT2 3'-UTR region is associated with an increase in the AD risk and a potential miR-dependent decrease in FERMT2 expression. It is noteworthy that the rs7134400 SNP is in perfect linkage disequilibrium ( $r^2 = 1$ ) with rs62003531, which exhibited the most significant association with the CSF level of A $\beta$ 42. Taken as a whole, our data suggest that the rs7134400 T allele is associated with an increased AD risk by lowering FERMT2 expression; in turn, this disrupts APP metabolism and favors A $\beta$  production.

Lastly, we recently highlighted the fact that several GWAS-defined genes already known to be involved in the focal adhesion pathway (*Fak*, *Cass4* and *EPHA1*) are potential modulators of Tau toxicity in *Drosophila* [9]. Since genetic risk factors involved in cell adhesion signaling have been associated with A $\beta$  production or Tau toxicity, we suggest that the characterization of these mechanisms should deepen our understanding of the link between amyloid and Tau in the AD process. FERMT2 might be located at the interface between these two hallmarks pathological processes because it has already been described as a modulator of Tau toxicity in *Drosophila* [23].

**Acknowledgements** This work was funded by France Alzheimer association. We acknowledge Dr Wimm Annart (Center for Human Genetics, Catholic University of Leuven) for providing the plasmid for chery-APP-YFP expression. We thank the Bioluminescence Center Lille-Nord de France (BICeL) facility (Lille, France). F.E. was funded by the Institute Pasteur de Lille and the Nord-Pas de Calais Regional Council. This work was also funded by the French National Foundation on Alzheimer's disease and related disorders, the Lille Métropole Communauté Urbaine council, and the French government's LABEX DISTALZ program (development of innovative strategies for a trans-disciplinary approach to Alzheimer's disease). S.D. was funded by the Alzheimer's association (BFG-14-318355). T.M. was funded by a CIFRE grant in partnership with SANOFI. ADNI is funded by the National Institute on Aging, the National Institute of Biomedical Imaging and Bioengineering, and through generous contributions from the following: Alzheimer's Association; Alzheimer's Drug Discovery Foundation; BioClinica, Inc.; Biogen Idec Inc.; Bristol-Myers Squibb Company; Eisai Inc.; Elan Pharmaceuticals, Inc.; Eli Lilly and Company; F. Hoffmann-La Roche Ltd and its affiliated company Genentech, Inc.; GE Healthcare; Innogenetics, N.V.; IXICO Ltd.; Janssen Alzheimer Immunotherapy Research & Development, LLC.; Johnson & Johnson Pharmaceutical Research & Development LLC.; Medpace, Inc.; Merck & Co., Inc.; Meso Scale Diagnostics, LLC.; NeuroRx Research; Novartis Pharmaceuticals Corporation; Pfizer Inc.; Piramal Imaging; Servier; Synarc Inc.; and Takeda Pharmaceutical Company. The Canadian Institutes of Health Research is providing funds to support ADNI clinical sites in Canada. Private sector contributions are facilitated by the Foundation for the National Institutes of Health (<https://www.fnih.org>). The grantee organization is the Northern California Institute for Research and Education, and the study is coordinated by the Alzheimer's Disease Cooperative Study at the University of California, San Diego. ADNI data are disseminated by the Laboratory for Neuro Imaging at the University of California, Los Angeles. This research was also supported by NIH grants P30 AG010129 and K01 AG030514, the Penn ADCC grant P30 AG010124-25, the ADNI grant U01 AG024904-16 and the National Institutes of Health grant R01AG042611. H.Z. is a Wallenberg Academy Fellow.

#### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** TM was a PhD student paid by SANOFI through a CIFRE contract.

**Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.



## References

- Baranger K, Marchalant Y, Bonnet AE, Crouzin N, Carrete A, Paumier J-M et al (2016) MT5-MMP is a new pro-amyloidogenic proteinase that promotes amyloid pathology and cognitive decline in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Cell Mol Life Sci* 73:217–236. doi:10.1007/s00018-015-1992-1
- Bray M-A, Carpenter A, Imaging Platform BI of M and H (2013) Advanced assay development guidelines for image-based high content screening and analysis. Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences
- Camargo LM, Zhang XD, Loerch P, Caceres RM, Marine SD, Uva P et al (2015) Pathway-based analysis of genome-wide siRNA screens reveals the regulatory landscape of App processing. *PLoS One* 10:e0115369. doi:10.1371/journal.pone.0115369
- Caswell PT, Vadrevu S, Norman JC (2009) Integrins: masters and slaves of endocytic transport. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:843–853. doi:10.1038/nrm2799
- Chapuis J, Vingtdoux V, Campagne F, Davies P, Marambaud P (2011) Growth arrest-specific 1 binds to and controls the maturation and processing of the amyloid-beta precursor protein. *Hum Mol Genet* 20:2026–2036. doi:10.1093/hmg/ddr085
- Checler F (1995) Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 65:1431–1444
- Cruchaga C, Kauwe JSK, Harari O, Jin SC, Cai Y, Karch CM et al (2013) GWAS of cerebrospinal fluid tau levels identifies risk variants for Alzheimer's disease. *Neuron* 78:256–268. doi:10.1016/j.neuron.2013.02.026
- Delay C, Grenier-Boley B, Amouyel P, Dumont J, Lambert J-C (2016) miRNA-dependent target regulation: functional characterization of single-nucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Alzheimers Res Ther* 8:20. doi:10.1186/s13195-016-0186-x
- Dourlen P, Fernandez-Gomez FJ, Dupont C, Grenier-Boley B, Bellenguez C, Obriot H et al (2016) Functional screening of Alzheimer risk loci identifies PTK2B as an in vivo modulator and early marker of Tau pathology. *Mol Psychiatry*. doi:10.1038/mp.2016.59
- Fagan AM, Mintun MA, Mach RH, Lee S-Y, Dence CS, Shah AR et al (2006) Inverse relation between in vivo amyloid imaging load and cerebrospinal fluid A $\beta$ <sub>42</sub> in humans. *Ann Neurol* 59:512–519. doi:10.1002/ana.20730
- Fagan AM, Younkin LH, Morris JC, Fryer JD, Cole TG, Younkin SG et al (2000) Differences in the Abeta40/Abeta42 ratio associated with cerebrospinal fluid lipoproteins as a function of apolipoprotein E genotype. *Ann Neurol* 48:201–210
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S et al (2012) A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature* 488:96–99
- Lambert J-C, Amouyel P (2011) Genetics of Alzheimer's disease: new evidences for an old hypothesis? *Curr Opin Genet Dev* 21:295–301. doi:10.1016/j.gde.2011.02.002
- Lambert J-CC, Ibrahim-Verbaas CA, Harold D, Naj AC, Sims R, Bellenguez C et al (2013) Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease. *Nat Genet* 45:1452–1458. doi:10.1038/ng.2802
- Letronne F, Laumet G, Ayrat A-M, Chapuis J, Demiautte F, Laga M et al (2016) ADAM30 downregulates APP-linked defects through cathepsin D activation in Alzheimer's Disease. *EBio-Medicine*. doi:10.1016/j.ebiom.2016.06.002
- Morel E, Chamoun Z, Lasiecka ZM, Chan RB, Williamson RL, Vetanovetz C et al (2013) Phosphatidylinositol-3-phosphate regulates sorting and processing of amyloid precursor protein through the endosomal system. *Nat Commun* 4:1–13. doi:10.1038/ncomms3250
- Müller UC, Zheng H (2012) Physiological functions of APP family proteins. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2:a006288. doi:10.1101/cshperspect.a006288
- Pluskota E, Ma Y, Bledzka KM, Bialkowska K, Soloviev DA, Szpak D et al (2013) Kindlin-2 regulates hemostasis by controlling endothelial cell-surface expression of ADP/AMP catabolic enzymes via a clathrin-dependent mechanism. *Blood* 122:2491–2499. doi:10.1182/blood-2013-04-497669
- Qu H, Tu Y, Guan J-L, Xiao G, Wu C (2014) Kindlin-2 tyrosine phosphorylation and interaction with Src serve as a regulatable switch in the integrin outside-in signaling circuit. *J Biol Chem* 289:31001–31013. doi:10.1074/jbc.M114.580811
- Reynolds AR, Hart IR, Watson AR, Welti JC, Silva RG, Robinson SD et al (2009) Stimulation of tumor growth and angiogenesis by low concentrations of RGD-mimetic integrin inhibitors. *Nat Med* 15:392–400. doi:10.1038/nm.1941
- Sannerud R, Declercq I, Peric A, Raemaekers T, Menendez G, Zhou L et al (2011) ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci USA* 108:E559–E568. doi:10.1073/pnas.1100745108
- Sheng B, Song B, Zheng Z, Zhou F, Lu G, Zhao N et al (2009) Abnormal cleavage of APP impairs its functions in cell adhesion and migration. *Neurosci Lett* 450:327–331. doi:10.1016/j.neulet.2008.11.046
- Shulman JM, Imboywa S, Giagtzoglou N, Powers MP, Hu Y, Devenport D et al (2014) Functional screening in *Drosophila* identifies Alzheimer's disease susceptibility genes and implicates Tau-mediated mechanisms. *Hum Mol Genet* 23(4):870–877. doi:10.1093/hmg/ddt478
- Sosa LJ, Bergman J, Estrada-Bernal A, Glorioso TJ, Kittelson JM, Pfenninger KH (2013) Amyloid precursor protein is an autonomous growth cone adhesion molecule engaged in contact guidance. *PLoS One* 8:e64521. doi:10.1371/journal.pone.0064521
- Theodosiou M, Widmaier M, Böttcher RT, Rognoni E, Veelders M, Bharadwaj M et al (2016) Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife*. doi:10.7554/eLife.10130
- Willem M, Tahirovic S, Busche MA, Ovspeian S V, Kocot S, Hornburg D et al (2015)  $\eta$ -Secretase processing of APP inhibits neuronal activity in the hippocampus. *Nature* 526(7573):443–447. doi:10.1038/nature14864
- Young-Pearse TL, Chen AC, Chang R, Marquez C, Selkoe DJ (2008) Secreted APP regulates the function of full-length APP in neurite outgrowth through interaction with integrin beta1. *Neural Dev* 3:15. doi:10.1186/1749-8104-3-15
- Zhang Z, Song M, Liu X, Su Kang S, Duong DM, Seyfried NT et al (2015) Delta-secretase cleaves amyloid precursor protein and regulates the pathogenesis in Alzheimer's disease. *Nat Commun* 6:8762. doi:10.1038/ncomms9762



## Alzheimer's genetic risk factor *FERMT2* (Kindlin-2) controls axonal growth and synaptic plasticity in an APP-dependent manner

Fanny Eysert<sup>1</sup> · Audrey Coulon<sup>1</sup> · Emmanuelle Boscher<sup>2,3</sup> · Anaïs-Camille Vreux<sup>1</sup> · Amandine Raig<sup>1</sup> · Tiago Mendes<sup>1</sup> · Sandrine Hughes<sup>4</sup> · Benjamin Grenier-Boley<sup>1</sup> · Xavier Hanouille<sup>5</sup> · Florie Demiautte<sup>1</sup> · Charlotte Bauer<sup>6</sup> · Mikael Marttinen<sup>7</sup> · Mari Takalo<sup>7</sup> · Philippe Amouyel<sup>6</sup> · Shruti Desai<sup>1</sup> · Ian Pike<sup>8</sup> · Mikko Hiltunen<sup>7</sup> · Frédéric Chécler<sup>6</sup> · Mélissa Farinelli<sup>4</sup> · Charlotte Delay<sup>1</sup> · Nicolas Malmanche<sup>1</sup> · Sébastien S. Hébert<sup>2,3</sup> · Julie Dumont<sup>1</sup> · Devrim Kilinc<sup>1</sup> · Jean-Charles Lambert<sup>6</sup> · Julien Chapuis<sup>6</sup>

Received: 12 December 2019 / Revised: 2 October 2020 / Accepted: 19 October 2020 / Published online: 3 November 2020  
© The Author(s) 2020. This article is published with open access, corrected publication 2020

### Abstract

Although APP metabolism is being intensively investigated, a large fraction of its modulators is yet to be characterized. In this context, we combined two genome-wide high-content screenings to assess the functional impact of miRNAs and genes on APP metabolism and the signaling pathways involved. This approach highlighted the involvement of *FERMT2* (or Kindlin-2), a genetic risk factor of Alzheimer's disease (AD), as a potential key modulator of axon guidance, a neuronal process that depends on the regulation of APP metabolism. We found that *FERMT2* directly interacts with APP to modulate its metabolism, and that *FERMT2* underexpression impacts axonal growth, synaptic connectivity, and long-term potentiation in an APP-dependent manner. Last, the rs7143400-T allele, which is associated with an increased AD risk and localized within the 3'UTR of *FERMT2*, induced a downregulation of *FERMT2* expression through binding of miR-4504 among others. This miRNA is mainly expressed in neurons and significantly overexpressed in AD brains compared to controls. Altogether, our data provide strong evidence for a detrimental effect of *FERMT2* underexpression in neurons and insight into how this may influence AD pathogenesis.

These authors contributed equally: Jean-Charles Lambert, Julien Chapuis

**Supplementary information** The online version of this article (<https://doi.org/10.1038/s41380-020-00926-w>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Julien Chapuis  
julien.chapuis@pasteur-lille.fr

<sup>1</sup> Université de Lille, Inserm, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, U1167—RID-AGE—Facteurs de Risque et Déterminants Moléculaires des Maladies Liées au Vieillessement, Lille 59019, France

<sup>2</sup> Centre de Recherche du CHU de Québec-Université Laval, CHUL, Axe Neurosciences, Québec City, QC, Canada

<sup>3</sup> Faculté de Médecine, Département de Psychiatrie et de Neurosciences, Université Laval, Québec City, QC, Canada

### Introduction

AD is a neurodegenerative disease characterized by two main pathological hallmarks: (i) intracellular neurofibrillary tangles consisting of hyperphosphorylated Tau proteins and (ii) extracellular amyloid plaques consisting of aggregates of  $\beta$ -amyloid (A $\beta$ ) peptides resulting from the processing of amyloid precursor protein (APP). Three main proteases ( $\alpha$ -,  $\beta$ -, and  $\gamma$ -secretases) are involved in APP processing through (i) the amyloidogenic pathway

<sup>4</sup> E-Phy-Science, Bioparc de Sophia Antipolis, 2400 route des Colles, Biot 06410, France

<sup>5</sup> Université de Lille, CNRS, UMR8576—Labex DISTALZ, Villeneuve d'Ascq 59655, France

<sup>6</sup> Université Côte d'Azur, Inserm, CNRS, IPMC, DistAlz Laboratory of Excellence, Valbonne, France

<sup>7</sup> Institute of Biomedicine, University of Eastern Finland, Kuopio, Finland

<sup>8</sup> Proteome Sciences plc, Hamilton House, London WC1H 9BB, UK

REPRODUCTION

( $\beta$ - and  $\gamma$ -secretases), leading to A $\beta$  production, and (ii) the non-amyloidogenic pathway ( $\alpha$ - and  $\gamma$ -secretases), which prevents A $\beta$  generation by cleaving APP within the A $\beta$  sequence [1].

The identification of early-onset autosomal-dominant AD-linked mutations in the genes for APP and presenilins (*PSEN1* and *PSEN2*, part of the  $\gamma$ -secretase), has placed abnormal APP metabolism at the center of the disease, further supporting the amyloid-cascade hypothesis [2, 3]: the overproduction of A $\beta$  peptides—especially the longer forms that are thought to be more neurotoxic—may lead to (or favor) Tau pathology and subsequent neuronal death.

Although the validity of the amyloid-cascade hypothesis is debated [4], the importance of APP has recently been emphasized by the discovery of a rare APP mutation hampering A $\beta$  production that lowers AD risk [5]. Moreover, loss-of-function variants in Sortilin-related receptor (L(DLR class A)), which is a strong regulator of APP metabolism and A $\beta$  production, are associated with early- and late-onset forms of AD [6–8]. Beyond A $\beta$  production, the involvement of genetic risk factors, such as APOE and TREM2 in modulation of A $\beta$  aggregation and/or degradation/clearance, has been proposed to be essential in the AD process [9, 10]. Recent high-throughput genomic approaches have also highlighted APP metabolism in the AD pathophysiological process: the main actors of APP metabolism, e.g., ADAM10 and APH1B (part of the  $\gamma$ -secretase complex), have been characterized as genetic determinants [11, 12], and numerous other genetic determinants have been described as potential modulators of APP metabolism (for a review, see ref. [13]).

Among these genetic determinants, FERMT2 has been identified to be involved in APP metabolism using an agnostic, systematic approach, i.e., high-content screening of 18,107 siRNA pools in HEK293 cells stably overexpressing an APP fusion protein (mCherry-APP<sup>695WT</sup>-YFP) that allows for the quantification of intracellular APP fragments [14]. Following this initial screening, FERMT2 underexpression was then specifically associated with increasing levels of mature APP at the cell surface, where FERMT2 facilitates APP recycling, resulting in increased A $\beta$ -peptide production [14].

Little is known about FERMT2. This protein localizes to focal adhesions, where it is proposed to interact with  $\beta$ 3 integrin and to be a major actor in integrin activation [15]. FERMT2 has been reported as a key protein involved in cardiac and skeletal muscle development [16], and has been involved in cancer progression [17–19]. However, despite the fact that FERMT2 is a genetic risk factor of AD, the physiological and/or pathophysiological roles of FERMT2 in the brain have not been identified. Within this background, we sought to determine how FERMT2 regulation

impacts APP metabolism and/or AD risk and its involvement in neuronal functions.

## Methods

### Cell culture

Human HeLa (RRID:CVCL\_0030) and HEK293 (RRID:CVCL\_0045) cells were respectively maintained in Eagle's minimal essential medium (American Type Culture Collection, Teddington, UK) and DMEM/Ham's F-12 1:1 medium (Life Technologies, Carlsbad, CA) supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum and 2-mM L-glutamine, penicillin (10 UI/mL)/streptomycin (10  $\mu$ g/mL). All cell lines were tested negative for mycoplasma contamination using PCR test (Venor GeM OneStep, Minerva Biolabs, Germany).

### Microfluidic chip fabrication

Masters of multicompartiment microfluidic devices were fabricated through photolithography as previously described [20]. Polydimethylsiloxane (PDMS, Sylgard 184, Dow Corning, Midland, MI) pads were replica-molded (2 h at 70 °C) and irreversibly bonded to glass coverslips via O<sub>2</sub> plasma (Diener, Ebhausen, Germany). The devices were placed in plastic Petri dishes, wetted with dH<sub>2</sub>O, and UV-sterilized for 30 min.

### Primary neuronal culture and viral transductions

Animal housing and experimentation were carried out in accordance with the French Council in Animal Care guidelines for the care and use of animals and following the protocols approved by the Institut Pasteur de Lille ethical committee. Primary neuronal cultures were obtained from hippocampus or cortices of postnatal (P0) rats as described previously [21]. Briefly, after the dissection of the brains, hippocampi were washed three times in HBSS (HBSS, 1-M HEPES, penicillin/streptomycin, and 100-mM sodium pyruvate, Gibco) and were dissociated via trypsin digestion (2.5%, 37 °C, Gibco) for 7 min. Next, hippocampi were incubated with DNase (5 mg/mL, Sigma) for 1 min and washed again in MEM medium supplemented with 10% SVF, 1% GlutaMax, 0.8% MEM vitamins, 0.5% penicillin/streptomycin, and 0.45% D-glucose (Sigma). With a pipette, hippocampi were mechanically dissociated and resuspended in Neurobasal A medium (Gibco) supplemented with 2% B27 (Gibco) and 0.25% GlutaMax. In total, 200,000 neurons were seeded per well in 24-well plates. In total, 50,000 neurons were seeded in the somatic chamber of microfluidic devices, precoated with poly-L-lysine (0.1 mg/mL, Sigma)

OPEN ACCESS



in borate buffer (0.31% boric acid, 0.475% sodium tetraborate, pH = 8.5). About 0.1% EDTA (in H<sub>2</sub>O) was added to the Petri dishes containing microfluidic devices to minimize evaporation. The culture medium was refreshed every 3 days. Neurons were maintained at 37 °C in a humidified 5% CO<sub>2</sub> incubator.

### Lentiviral transductions

Lentiviral transductions were carried out at 1 day in vitro (DIV1) with a multiplicity of infection (MOI) of 10. In the case of co-transduction, MOI of 5 was used for each lentivirus. Briefly, lentiviruses were diluted in culture medium containing 4-μg/mL polybrene (hexadimethrine bromide, Sigma) and were added to the cells. After 6 h of transduction, lentivirus suspension was replaced with fresh medium. The following lentiviruses were used for transduction: Mission shRNA vectors (Sigma) shNT (Non-Mammalian shRNA Control, SHC002), shFERMT2 (TRCN0000191859), shAPP (TRCN000006707), and pLenti6 empty vectors (Mock) or including human FERMT2<sup>WT</sup> or FERMT2<sup>QW</sup> cDNA sequences. LifeAct-Ruby lentivirus (pLenti.PGK.LifeAct-Ruby.W: RRID:Addgene\_51009) was a kind gift from Rusty Lansford.

### RFLP genotyping

Genomic DNA in the vicinity of the rs7143400 was amplified by PCR using the following primers 5'-GGTTGGGTGTGAATAGGAAT-3' and 5'-TGCATGCCTGATTATTTGG-3' before digestion with Tsp45I enzyme (Thermo Scientific). Finally, treated PCR products were analyzed in 2% agarose gel to visualize the cleavage bands.

### Designing CRISPR/Cas9 and genome editing

gRNA sequences were predicted by Benchling (<http://www.benchling.com>) and cloned into the GeneArt CRISPR OFF Nuclease Vector (ThermoFisher Scientific) allowing Cas9 and gRNA expression. Homology-directed repair was induced by co-transfection of 71-pb double-stranded DNA oligonucleotide template, including rs7143400-T allele in HEK293 cells (Supplementary Fig. 1). HEK293 clones were isolated by limiting dilution before RFLP genotyping. Sequence integrity of the FERMT2 3'UTR and predicted potential off-target sites were validated by Sanger sequencing (Supplementary Fig. 1).

### Visualization of miRNA expression at the single-cell level

To visualize RNA molecules by fluorescence at single-cell resolution and quantify gene expression, we used

ViewRNA Cell Plus Assay kit (ThermoFisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. Briefly, after fixation and permeabilization, cells were washed 3× with PBS containing RNAse inhibitor and were incubated with probes directed against specific mRNA or miRNA for 2 h at 40 °C. After washes, probes were amplified, first, in a pre-amplifier solution, and second, in an amplifier solution, both for 1 h at 40 °C. Then, cells were incubated with nucleotide probes stained with different fluorophores, allowing the detection of mRNA or miRNA puncta. This approach was coupled with immunofluorescence experiments described.

### miRNA quantification in human brain samples

This study was approved by CHU de Québec—Université Laval Research Ethics Committee (#2017-3017). Frozen human brain tissue (0.5–1.2 g per sample) was obtained from the Harvard Brain Tissue Resource Center in Belmont, USA, the Brain Endowment Bank in Florida, USA, and the Human Brain and Spinal Fluid Resource Center in Los Angeles, USA, via NIH Neurobiobank. The cohort of patients included nondementia controls ( $n = 30$ ) and AD cases ( $n = 52$ ) based on neuropathological diagnosis. Upon receipt of the specimens, frozen postmortem parietal cortex (BA39) was crushed using a biopulverizer prior to RNA extraction and analysis.

Total RNA was extracted from brain tissue (Supplementary Table 1) using TRIzol reagent (Ambion, 15596018) according to the manufacturer's instructions. miRNA quantifications were done using the TaqMan miR Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, Burlington, Canada) and TaqMan Universal Master Mix (Applied Biosystem, 4324018) following the manufacturer's instructions. Primers were purchased from ThermoFisher (miR-4504 ID: 464271\_mat; RNU48 ID: 001006; miR-222-3p ID: 002276). MiR-4504 and miR-222 levels were normalized to RNU48. The relative amounts of each mature miRNA were calculated using the comparative Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) method [22].

### Immunoblotting and Aβ quantification

Equal amounts (10–25 μg) of cell lysate were collected in RIPA buffer (1-M Tris, 1.5-M NaCl, 0.1% NP-40, 10% SDS, 100-mM sodium orthovanadate, and 0.5% sodium deoxycholate, pH = 7.4) containing protease inhibitors (Complete mini, Roche Applied Science, Penzberg, Germany), lithium dodecyl sulfate (LDS), and reducing agent (Invitrogen). Samples were denatured and analyzed using SDS-PAGE and the following antibodies: human FERMT2 (RRID:AB\_10727911), APP C-terminal domain (RRID:AB\_258409), actin (RRID:AB\_476692), Aβ clone 6E10 (RRID:AB\_662798), Aβ clone 4G8 (RRID:AB\_662812), Synaptophysin I (RRID:AB\_887824), PSD95 (RRID:

REPRODUCIBLE



AB\_2619800), and GAPDH (RRID:AB\_10615768). Extracellular culture media were collected in order to dose-secrete A $\beta$  using Alpha-LISA assays (Alpha-LISA Amyloid  $\beta$ -x Kit, AL288C, PerkinElmer) according to the manufacturer's instructions.

### Cell-surface biotinylation

HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells were transfected with PCDNA4.1, FERMT2<sup>WT</sup>, or FERMT2<sup>QW</sup> (PCDNA4/HisMax, Thermo Scientific V86420) for 48 h. Next, cell-surface proteins were biotinylated using sulfo-NHS-SS-biotin (sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate) for 30 min at 4 °C according to the manufacturer's instructions (Cell Surface Protein Isolation Kit, Pierce, 89881). Then, cells were lysed and immunoprecipitated with streptavidin beads. Precipitated proteins were eluted from the beads with loading buffer containing 50-mM DTT, heated for 10 min at 95 °C, and analyzed by WB.

### Co-immunoprecipitation

Equal amounts of protein were collected in co-immunoprecipitation buffer (10-mM HEPES, 140-mM NaCl, and 0.5% NP-40, pH = 7.4) containing protease inhibitors (Complete mini, Roche Applied Science) and phosphatase inhibitor (100-mM sodium orthovanadate) and incubated with the primary A $\beta$  antibody clone 4G8 (RRID:AB\_662812) overnight, with gentle rocking. Production of recombinant C100 fragment was performed as previously described [23]. Co-immunoprecipitation was carried out using Pierce Protein A/G magnetic beads kit (Thermo Scientific, 88802) according to the manufacturer's instructions. Samples with proteins and antibody complexes were incubated with 25  $\mu$ L (0.25 mg) of A/G magnetic beads previously washed with co-immunoprecipitation buffer. After 1 h of incubation at 4 °C, the magnetic beads were washed 3 $\times$ , resuspended with loading buffer (LDS and reducing agent) for 10 min at RT, and analyzed by WB.

### Immunofluorescence and PLA

Cells were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) for 15 min, washed 3 $\times$  with PBS, and permeabilized for 5 min with 0.3% Triton X-100. Cells were incubated with 5% normal donkey serum for 2 h at RT before overnight incubation with the following primary antibodies: human FERMT2 (RRID: AB\_10727911), Kindlin-2 (RRID:AB\_2278298), APP C-terminal domain (RRID:AB\_258409), APP A4 clone 22C11 (RRID:AB\_94882), Synaptophysin I (RRID:AB\_887824), PSD95 (RRID:AB\_2619800), Homer (RRID:AB\_2631222), and  $\alpha$ -Tubulin (RRID:AB\_2210391). The cells were then

washed 3 $\times$  with PBS and incubated with the following secondary antibodies raised in donkey (AlexaFluor-conjugated AffiniPure Fragment 405, 488, 594, or 647, Jackson ImmunoResearch), 1:10,000 Hoechst 33342, or 1/40 SiR-Actin probe (SC001, Spirochrome). Alternatively, Kindlin-2 (RRID:AB\_2278298) and APP A4 22C11 (RRID: AB\_94882) antibodies were used for the proximity-ligation assay (PLA) according to the manufacturer's instructions (Duolink<sup>2</sup>, Olink Bioscience).

### Live-cell microscopy for axon elongation and actin dynamics

After DIV5, once the axons reached the axonal chamber of microfluidic devices, the culture medium was replaced with Neurobasal A without phenol red, supplemented with GlutaMax, 2% B<sub>27</sub>, and 25-mM HEPES. Phase-contrast images of growing axons were acquired every 10 min for 110 min using Zeiss AxioObserver Z1 microscope equipped with a Prime 95B Scientific CMOS (Photometrics, Tucson, AZ) camera and 32 $\times$  objective. Movies were analyzed using Fiji MTrack J Plugin [24] to determine the axon-growth speed.

To visualize filamentous actin (F-actin) dynamics in the growth cones of elongating axons, neurons were co-transduced with LifeAct-Ruby at DIV1. At DIV5, growth cones expressing LifeAct-Ruby were imaged using a Nikon microscope equipped with Yokogawa spinning-disk system and a Nikon CFI Apochromat 100 $\times$  TIRF objective (NA 1.49), in live superresolution mode (66 nm/px). Processed movies were analyzed using Imaris (Biplane, Zurich, Switzerland) surface tracking tool to obtain the speed and direction of F-actin puncta undergoing actin-retrograde flow.

### Synaptosome extraction

To verify the presence of proteins at the synaptic level, we did a subcellular fractionation as previously described [25]. Briefly, cortical neurons were resuspended in a solution (0.32-M sucrose and 10-mM HEPES, pH = 7.4) and were centrifuged at 1000  $\times$  g for 10 min to remove nuclei and debris. The supernatant was centrifuged at 12,000  $\times$  g for 20 min to remove the cytosolic fraction. The pellet was resuspended in a second solution (4-mM HEPES, 1-mM EDTA, pH = 7.4) and was centrifuged 2 $\times$  at 12,000  $\times$  g for 20 min. The new pellet was resuspended in a third solution (20-mM HEPES, 100-mM NaCl, and 0.5% Triton X-100, pH = 7.2) for 1 h at 4 °C and centrifuged at 12,000  $\times$  g for 20 min. The supernatant collected corresponds to the non-PSD fraction (Triton-soluble). The remaining pellet was resuspended in a fourth solution (20-mM HEPES, 0.15-mM NaCl, 1% Triton X-100, 1% deoxycholic acid, and 1% SDS,

PROCEEDINGS

pH = 7.5) for 1 h at 4 °C and was centrifuged at  $10,000 \times g$  for 15 min to obtain a supernatant containing the PSD fraction (Triton-insoluble). The different fractions were then analyzed by WB.

#### Quantification of synaptic connectivity

To quantify synaptic connectivity, we transduced primary hippocampal neurons in pre- and/or postsynaptic compartments of microfluidic devices at DIV1 with lentiviruses carrying shNT and/or shFERMT2 (MOI = 10). At DIV14, cultures were fixed and immunostained against Synaptophysin I and Homer pre- and postsynaptic markers, respectively. Synaptic compartments were imaged with Zeiss LSM880 confocal microscope, using a 63 $\times$  1.4-NA objective and the AiryScan superresolution unit. Images were analyzed with Imaris software (Bitplane, Zürich, Switzerland) by reconstructing Synaptophysin I and Homer puncta in 3D. The volume and position information of all puncta were processed using a custom Matlab (MathWorks, Natick, MA) program. This program assigns each postsynaptic spot to the nearest presynaptic spot (within a distance threshold of 1  $\mu$ m) and calculates the number of such assignments for all presynaptic puncta. The percentage of presynaptic spots not assigned by any postsynaptic spot was consistently used as a readout of synaptic connectivity [26].

#### Lentivirus injection

For stereotaxic injections, C57Bl6/J mice (RRID: IMSR\_JAX:000664) were anesthetized with 4% isoflurane (2 L/min) and placed in a stereotaxic frame (68528, RWD Life Science, Shenzhen, China) in which the head of the animal was fixed with a pair of ear bars and a perpendicular tooth bar. During surgical procedures, 1.5% isoflurane (2 L/min) was delivered through a facial mask via spontaneous respiration. Their body temperature was maintained between 36.5 and 37.5 °C with a homeothermic blanket. The head was shaved and Vetedine was applied. Wounds and pressure points were infiltrated with lidocaine. A skin incision was made along the sagittal midline of the scalp. Craniotomy was made to target the structures of interest. Lentiviruses were injected into the right and left hippocampus (1.5  $\mu$ L per hemisphere, 0.2  $\mu$ L/min). After injections, wound clips were used for skin closure. For the sham group, surgical procedures were performed without any injection. During the surgery, the level of anesthesia was regularly verified by testing the nociceptive hind-limb withdrawal reflex. Subjects were then allowed to recover in their home cages for at least 7 days before sacrifice for ex vivo electrophysiological recordings.

#### RESULTS

#### Hippocampal acute-slice preparation

One week after the surgery, sagittal hippocampal brain slices were obtained using standard brain-slicing methods. Mice were deeply anesthetized with isoflurane and decapitated. The brain was quickly removed and immersed in ice-cold preoxygenated artificial cerebrospinal fluid (aCSF) containing 124-mM NaCl, 3.75-mM KCl, 2-mM MgSO<sub>4</sub>, 2-mM CaCl<sub>2</sub>, 26.5-mM NaHCO<sub>3</sub>, 1.25-mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10-mM glucose, and was continuously oxygenated (pH = 7.4, 27 °C). In all, 350- $\mu$ m-thick slices were prepared using a Vibratome (VT 1000S, Leica Microsystems, Bannockburn, IL), and placed in a holding chamber filled with aCSF. Slices were allowed to recover in these conditions at least 1 h before recording.

#### Electrophysiological recordings

For electrophysiological recordings, a single slice was placed in the recording chamber, submerged and continuously superfused with gassed (95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>) aCSF at a constant rate (2 mL/min). Extracellular field excitatory postsynaptic potentials (fEPSPs) were recorded in the CA1 stratum radiatum using a glass micropipette filled with aCSF. fEPSPs were evoked by the electrical stimulation of Schaffer collaterals/commissural pathway at 0.1 Hz with a glass-stimulating electrode placed in the stratum radiatum (100- $\mu$ s duration).

To test the effect of miRNA-expressing lentiviruses on basal synaptic transmission, input/output (I/V) curves were constructed at the beginning of the experiment. The slope of fEPSPs was measured and plotted against different intensities of stimulation (from 0 to 100  $\mu$ A).

Stable baseline fEPSPs were recorded by stimulating at 30% maximal field amplitude for 10 min prior to the beginning of the experiment (single-pulse stimulation every 10 s (0.1 Hz)). The same intensity of stimulation was kept for the remainder of the experiment. For the paired-pulse facilitation (PPF) protocol, two stimulations were applied with 50-, 100-, 150-, 200-, 300-, 400-, and 500-ms interval. For long-term potentiation (LTP) protocol, after a 10-min stable baseline period, LTP was induced by the following stimulation protocol: three trains of 100 stimulations at 100 Hz at the same stimulus intensity, with 20-s intervals between trains. Following this conditioning stimulus, a 1-h test period was recorded where responses were again elicited by a single-pulse stimulation every 10 s (0.1 Hz) at the same stimulus intensity. Signals were amplified with an Axopatch 200B amplifier (Molecular Devices, Union City, CA) digitized by a Digidata 1550 interface (Axon Instruments, Molecular Devices, San Jose, CA) and sampled at 10 kHz. Recordings were acquired using Clampex (Molecular Devices) and analyzed with Clampfit (Molecular



Devices). Experimenters were blinded to treatment for all experiments.

### Statistical analysis

No statistical methods were used to predetermine sample sizes; sample sizes were determined according to data reported in previous publications. All the results are presented as mean  $\pm$  SD. Statistically significant outliers were calculated and excluded, using the mean absolute deviation (MAD) method ( $\pm 3$  MAD). Data were analyzed either using nonparametric (Mann–Whitney) test or a two-way ANOVA (Kruskal–Wallis) for multiple comparisons, including Bonferroni's correction, as indicated in the figure legends. For electrophysiological recordings, unpaired *t* tests were used to compare groups of hippocampal slides. Data analysis was not blinded.

## Results

### *FERMT2* expression is dependent on miRNAs modulating APP metabolism

We used an unbiased screening approach to identify miRNAs that modulate APP metabolism in a HCS model that allows for the quantification of intracellular APP fragments [14]. We screened a total of 2555 mature human miRNAs in a 384-well-plate format allowing us to identify 50 miRNAs (top and bottom 1%) with the strongest impact on APP metabolism (Supplementary Table 2 and Supplementary Fig. 2). To determine which genes were potentially regulated by these top 50 hits, we selected the intersection of predictions resulting from at least four different algorithms (see "Methods") and thereby identified 6009 putative miRNA–target genes. To further refine the list of predicted genes, we cross-checked them against a list of 832 genes that we previously identified to have a major impact on APP metabolism in a genome-wide siRNA screening [14] (Supplementary Fig. 3). This resulted in 180 common genes that are putative targets of 41 miRNAs. To determine if any of these 180 genes were preferentially regulated by this pool of 41 miRNAs, we performed 1 million drawing lots of 41 miRNAs among the 2555 tested and compared them against the list of miRNAs predicted to bind in the 3'-UTR of each of the 180 genes (Supplementary Fig. 3). The AD genetic risk factor *FERMT2* (encoding Kindlin-2) was among the most significant genes (*p* value  $< 2.77 \times 10^{-4}$  after Bonferroni correction) that strongly modulate APP metabolism, and whose expression is potentially regulated by miRNAs that also strongly modulate APP metabolism. According to our screening, four miRNAs were predicted

to target *FERMT2* 3'UTR: miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, and miR-222-3p (Fig. 1a).

### miRNA-dependent *FERMT2* expression and genetic variation associated with AD risk

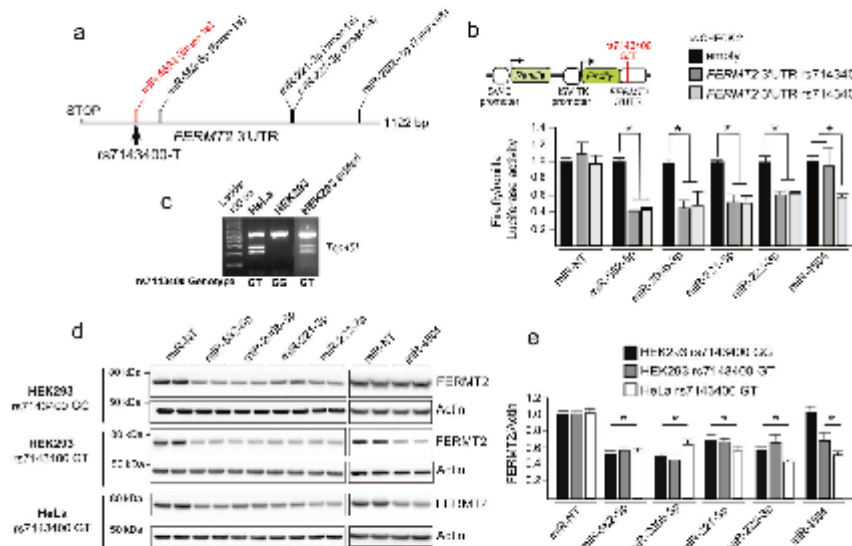
Our data indicate that regulation of the *FERMT2* expression is dependent on miRNAs, and we aimed to assess whether genetic variations associated with AD risk may modulate the miRNA-dependent expression of *FERMT2*. None of the variants localized within the *FERMT2* 3'-UTR were predicted to modify the binding of miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, or miR-222-3p to this region (Supplementary methods). In contrast, we had previously identified an AD-associated variant (rs7143400), where the minor T allele creates an 8-mer binding site for miR-4504 within the 3'-UTR of *FERMT2* [27] (Supplementary Fig. 4). This miRNA was not identified as a hit according to our screen, maybe due to the absence of rs7143400-T allele in HEK293 cell line (Fig. 1c). Of note, there is a strong linkage disequilibrium between rs7143400 and the GWAS hit rs17125924 ( $R^2 = 0.78$ ), and rs7143400 has a lower minor allele frequency (MAF = 0.09) and subsequently lower association ( $p = 7.14 \times 10^{-5}$ ) than rs17125924 (MAF = 0.20,  $p = 6.6 \times 10^{-7}$ ). Supporting these predictions, we observed that miR-4504 led to reduced luciferase expression only in the presence of *FERMT2* 3'UTR rs7143400-T allele, whereas the four other miRNAs were able to induce a downregulation, regardless of the rs7143400 allele (Fig. 1b).

We then assessed the impact of these five miRNAs on endogenous *FERMT2* expression levels after their transfection in either HEK293<sup>WT</sup> or rs7143400-mutated HEK293 cell lines (HEK293<sup>rs7143400-GT</sup>) generated by CRISPR–Cas9 technology (Fig. 1c and Supplementary Figs. 1 and 5). Accordingly, transfection of miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, or miR-222-3p in HEK293 cells led to reduced *FERMT2* expression whatever their genotype, while transfection of miR-4504 decreased the endogenous *FERMT2* expression only in the HEK293<sup>rs7143400-GT</sup> cell line (Fig. 1d, e). Similar effects were observed in HeLa cells that were genotyped to be heterozygous for rs7143400 (Fig. 1c–e and Supplementary Fig. 5).

### Impact of miRNAs targeting *FERMT2* on APP metabolism

These five miRNAs are thus potential candidates to modulate APP metabolism through a direct downregulation of *FERMT2*. However, these miRNAs can also potentially target other genes strongly modulating APP metabolism (Supplementary Table 3). We reasoned that if a candidate miRNA affects APP metabolism mainly through

SPRINGER NATURE



**Fig. 1** Validation of functional miRNAs targeting *FERMT2* 3' UTR. **a** Relative positions of miRNA-target sites on *FERMT2* 3' UTR. The target site created by the rs7143400-T allele, which is associated with AD risk, is shown in red. **b** Luciferase activity of *FERMT2* 3' UTR carrying either the rs7143400-G or the rs7143400-T allele in HEK293 cells co-transfected with a non-targeting miRNA (miR-NT) or 5 miRNA mimics. Data are expressed relative to the miR-NT. **c** RFLP genotyping of HeLa and HEK293 cell lines edited or not for the

rs7143400 via CRISPR-Cas9 (Supplementary Fig. 1). **d** Endogenous *FERMT2* expression levels were assessed by Western blot using indicated cell extracts following transient transfection with a non-targeting miR (miR-NT) or with the indicated miR for 72 h. **e** WB quantifications from three independent experiments as in **d**. Data given in mean  $\pm$  SD. \* $p < 0.05$ , nonparametric test compared to miR-NT condition.

downregulating *FERMT2*, this candidate miRNA would have similar effects on APP metabolism as the direct *FERMT2* downregulation by siRNAs we had previously demonstrated, i.e., leading to an increase in both intra- and extracellular by-products of APP [14]. To investigate this hypothesis, we used the data generated in our HCS approach (based on HEK293 cell line stably overexpressing a mCherry-APP695WT-YFP) in order to quantify intracellular by-products of APP [14, 28], and we also measured A $\beta$  and sAPP $\alpha$  secretion after miR-582-5p, miR-200b-3p, miR-221-3p, or miR-222-3p transfections.

Only miR-582-5p and miR-222-3p showed similar effects as *FERMT2* downregulation [14], i.e., they increased the levels of intracellular APP metabolites tagged by mCherry and YFP, and increased A $\beta$  and sAPP $\alpha$  secretion (Fig. 2a, b).

Since the potential effects of miR-4504 would depend on the presence of the rs7143400 minor T allele, we were not able to test for its impact in our HCS model. We nevertheless took advantage of HEK293<sup>rs7143400-GT</sup> cells by co-transfecting them with miR-4504 and mCherry-APP695WT-YFP cDNA in order to mimic our HCS model. When

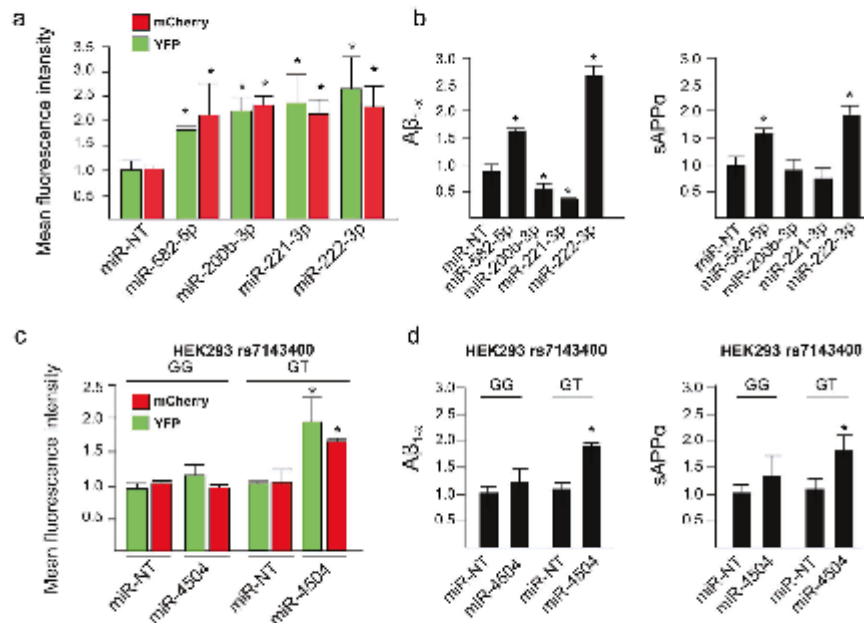
compared to HEK293<sup>rs7143400-G/G</sup>, the transfection of miR-4504 in HEK293<sup>rs7143400-GT</sup> led to an accumulation of intracellular APP mCherry and YFP-tagged metabolites and an increase in A $\beta$  and sAPP $\alpha$  secretion (Fig. 2c, d). MiR-4504 showed similar effects as *FERMT2* downregulation, and this observation further supports that miR-4504 regulates APP metabolism as a function of the *FERMT2* rs7143400 variant.

In conclusion, we characterized that regulation of *FERMT2* expression by miRNAs impacts APP metabolism, and potentially in a genetics-dependent manner.

#### miRNA expression in different hippocampal cell types and in AD brains

To provide further physiological relevance to our findings, we first combined classical immunocytochemistry with RNA hybridization that allows for the detection of miRNAs at single-copy sensitivity. We observed that miR-200, miR-222, and miR-4504 were mainly expressed in neurons when compared to astrocytes (Fig. 3a). We next measured the expression levels of these miRNAs in the postmortem brain

REPRODUCED FROM



**Fig. 2** Validation of the effects of FERMT2-targeting miRNA on APP metabolism. **a** Mean fluorescence intensity of intracellular mCherry and YFP signals obtained after miRNA transfection in HEK293 cells stably overexpressing a mCherry-APP<sup>695WT</sup>-YFP. **b** Quantification of Aβ and sAPPα secretion after miRNA transfection in HEK293 cells stably overexpressing a mCherry-APP<sup>695WT</sup>-YFP. **c** Mean fluorescence intensity variation of intracellular mCherry and

YFP signal obtained after miRNA transfection in HEK293<sup>rs7143400-GG</sup> or HEK293<sup>rs7143400-GT</sup> cell lines transiently overexpressing a mCherry-APP<sup>695WT</sup>-YFP. **d** Quantification of Aβ and sAPPα secretion after miRNA transfection in HEK293<sup>rs7143400-GG</sup> or HEK293<sup>rs7143400-GT</sup> cell lines transiently overexpressing a mCherry-APP<sup>695WT</sup>-YFP. Bar charts show mean ± SD. Mann-Whitney test; \**p* < 0.05.

samples from 52 AD patients and 30 control subjects. We observed that the expression levels of miR-200 and miR-4504 were significantly higher in AD brains than in controls (Fig. 3b). Collectively, these data suggest that endogenous FERMT2 expression and its impact on APP metabolism are dependent on the expression of several miRNAs, two of which are overexpressed in the brains of AD cases and, among these two, one impacts APP metabolism in the presence of a genetic variant associated with AD risk.

#### Pathway analyses suggest FERMT2/APP interaction to be involved in axonal growth

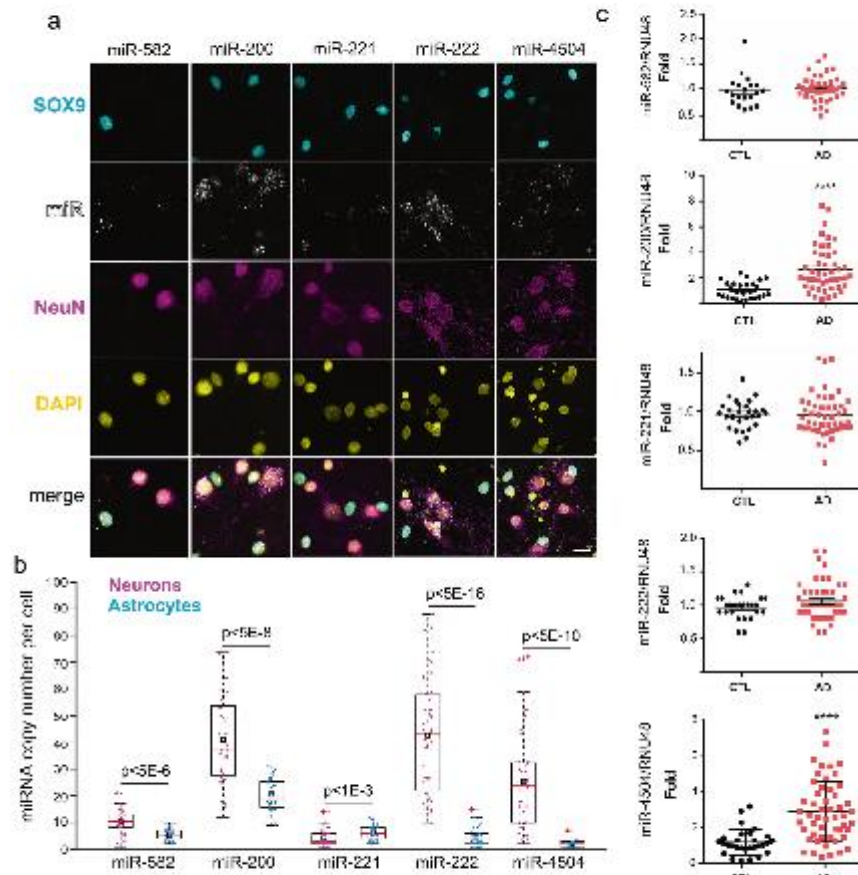
Little is known about the physiological processes that require the regulation of APP expression and/or its metabolism by miRNAs. To obtain a list of potential physiological pathways to be further investigated, pathway-enrichment analysis was performed using the 41 candidate miRNAs that strongly modified APP metabolism in our HCS (Supplementary Table 2). This analysis revealed that the candidate miRNAs

are predicted to regulate neuronal pathways, such as axonal guidance (Table 1a). Since these 41 miRNAs potentially target 180 genes that strongly modulate APP metabolism (Supplementary Table 3), we also performed pathway-enrichment analysis using these 180 genes. This analysis revealed that these genes are predicted to be involved in axonal guidance among others (Table 1b). In conclusion, both miRNAs and genes modulating APP metabolism, e.g., FERMT2, potentially play a role in axonal guidance.

APP is already known to be enriched in axonal growth cones during nervous system development and acts as a co-receptor for axon guidance and cell migration cues through its interaction with the extracellular matrix [29, 30]. We thus investigated the potential involvement of FERMT2 in axonal growth. Using primary neurons cultured in microfluidic devices that fluidically isolate axons from their cell bodies, we first observed the colocalization of endogenous FERMT2 with APP in the growth cones (Fig. 4a). We then addressed the impact of FERMT2 silencing on axonal growth cone morphology using lentiviral vectors expressing

FRONTIERS





**Fig. 3** miRNA expression in primary neuronal cultures and in AD brains. **a** Hybridization experiments in rat postnatal hippocampal neuronal cultures enabling single-copy detection of miRNA combined with immunocytochemistry against astrocytic (SOX9) and neuronal (NeuN) markers. Scale bar=20 $\mu$ m. The box plot shows the

quantification of miRNA copy number in SOX9- or NeuN-positive cells ( $N > 30$  cells for each condition). Black rectangles and red plus signs indicate sample mean and outliers, respectively. **b** Relative miRNA expression levels in temporal lobes of nondemented (CTL) and AD groups. Mann-Whitney test; \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

either shRNA against FERMT2 (shFERMT2) or a non-targeting shRNA (shNT). Actin staining revealed that FERMT2 underexpression led to a significant decrease in growth cone area ( $9.13 \pm 0.71$  vs.  $12.79 \pm 1.10 \mu\text{m}^2$ ), as well as in the angular dispersion of growth cone filopodia during axonal growth ( $0.67 \pm 0.04$  vs.  $0.84 \pm 0.02$ ) (Fig. 4b and Supplementary Fig. 6). Of note, no significant impact on actin-retrograde flow rate was observed ( $0.166 \pm 0.003$  vs.  $0.157 \pm 0.002 \mu\text{m/s}$ ). These observations suggest a potential impairment of the exploration behavior of the growth cones due to FERMT2 silencing, but not an effect on actin

dynamics per se. FERMT2 underexpression was also associated with an accumulation of endogenous APP in the growth cones ( $1.38 \pm 0.11$  vs.  $0.85 \pm 0.08$ , after normalization by the growth cone area).

By performing PLA, we observed PLA-FERMT2/APP signals in axonal growth cones (Fig. 4a), suggesting a potential function of the FERMT2/APP complex in axon-growth behavior. To address this, we first tested the possibility that APP and FERMT2 form a protein-protein complex via three complementary approaches: (i) pull down of endogenous APP from hippocampal primary neuronal

REPRODUCED



**Table 1** Results of pathway-enrichment analyses.

| KEGG pathway  | <i>p</i> value | #miRNAs |
|---|----------------|---------|
| (a) The ten most likely canonical pathways identified after pathway-enrichment analysis of 41 miRNAs that strongly modulate APP metabolism using DIANA Tools mirPath (v3.0) |                |         |
| Axon guidance   | 4.70E-08       | 48      |
| Proteoglycans in cancer   | 1.82E-06       | 49      |
| Hippo-signaling pathway   | 4.10E-06       | 50      |
| Fatty-acid biosynthesis   | 8.10E-05       | 11      |
| Glutamatergic synapse   | 8.56E-05       | 48      |
| GABAergic synapse   | 1.10E-04       | 48      |
| AMPK-signaling pathway  | 2.20E-04       | 46      |
| TGF-beta-signaling pathway  | 2.50E-04       | 45      |
| Thyroid hormone-signaling pathway   | 3.90E-04       | 48      |
| Adrenergic signaling in cardiomyocytes  | 5.00E-04       | 49      |
| (b) The ten most likely canonical pathways identified after pathway-enrichment analysis of 132 genes targeted by 41 miRNAs (see Supplementary Methods for details)          |                |         |
| KEGG pathway  | <i>p</i> value | #genes  |
| Axon guidance   | 0.0014         | 19      |
| Ubiquitin-mediated proteolysis  | 0.010          | 16      |
| Circadian rhythm  | 0.036          | 8       |

culture extracts co-immunoprecipitated endogenous FERMT2 (Fig. 4c). (ii) Overexpression of FERMT2<sup>WT</sup> was also able to pull down the recombinant intracellular domain of APP (Fig. 4d). (iii) In addition, we generated a Q621W622AA FERMT2 mutant (FERMT2<sup>QW</sup>) that was previously shown to abolish the interaction between the FERMT2 F3 domain and the NxTY motif of Integrin-β3 (which is also present within the intracellular domain of APP) [31]. Remarkably, when overexpressed in HEK293 cells, FERMT2<sup>QW</sup> was not able to pull down the recombinant intracellular domain of APP. Cumulatively, these findings support a direct interaction between FERMT2 and APP. Based on the recently solved crystal structure of FERMT2 in complex with the integrin-β3 tail [32], we built a structural model of the FERMT2/APP complex (Fig. 4e), supporting our hypothesis that a protein-protein interaction exists between FERMT2 and APP.

We next assessed the biological impact of the FERMT2/APP interaction on APP metabolism. By performing extracellular biotinylation experiments, we observed that FERMT2 overexpression in HEK293-APP<sup>695wt</sup> cell line decreased the levels of APP at the cell surface, an effect that was abolished by the presence of the QW mutation (Fig. 4f). Further, a dominant negative effect of the FERMT2<sup>QW</sup> mutant was observed: its overexpression impacted APP metabolism similarly to FERMT2 silencing, i.e., resulting in increased mature APP at the cell surface and increased Aβ production, as previously reported [14]. Altogether, our data

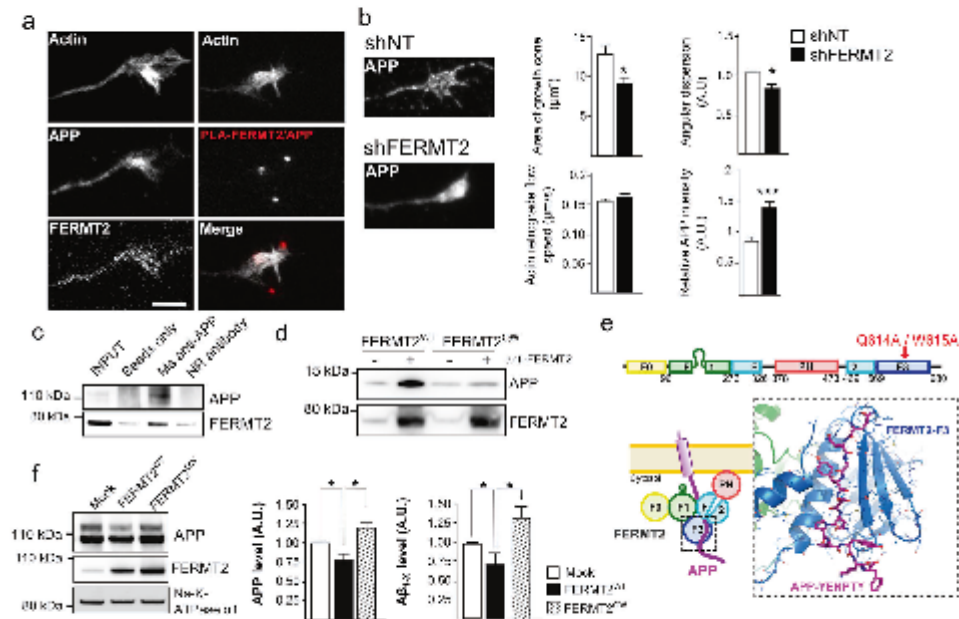
suggest that a FERMT2/APP interaction is necessary for FERMT2 to have an impact on APP metabolism.

In order to characterize in-depth the impact of FERMT2 and/or APP expression on axonal growth, we conducted time-lapse microscopy and measured axon-growth speed at DIV5 following lentiviral transduction (shNT, shFERMT2, or shAPP) of neurons in microfluidic devices at DIV1. FERMT2 silencing led to 31.7% increase in axon-growth speed (Fig. 5 and Supplementary Fig. 6). Conversely, APP underexpression led to 16.7% decrease in axon-growth speed. Remarkably, silencing of APP was able to fully abolish the effect of FERMT2 underexpression on axon-growth speed, suggesting that APP was required for the molecular mechanism by which FERMT2 controls the axon-growth speed. In addition, we observed that FERMT2<sup>QW</sup> mutant overexpression was able to induce 15.9% increase in axon-growth speed (Fig. 5). Since overexpression of FERMT2<sup>WT</sup> did not show any impact, these data also suggested a potential dominant negative effect of the FERMT2<sup>QW</sup> mutant and further supported the involvement of FERMT2/APP complex in axonal growth.

### FERMT2 is present at the synapse and controls synaptic connectivity

Next, we investigated the impact of FERMT2 silencing on neuronal maturation at DIV14. First, co-staining between FERMT2 and synaptic markers (Synaptophysin and Homer) suggested the localization of FERMT2 at the synapse (Fig. 6a). The presence of FERMT2 in both pre- and post-synaptic compartments was confirmed by synaptosomal purification (Fig. 6b). To control shRNA expression separately in pre- or postsynaptic neurons, hippocampal neurons were cultured in microfluidic devices that promote synapse formation in an isolated chamber [33]. Thanks to the use of narrow microchannels, these devices spatially isolate neurites from their cell bodies and allow lentiviral transductions to be conducted in different compartments, thereby allowing us to silence FERMT2 expression at the pre- and/or post-synaptic levels (Fig. 6c and Supplementary Fig. 6). The effects of shRNA expression (DIV1) on synaptic connectivity were assessed by confocal microscopy of synaptic markers (DIV14) followed by three-dimensional image segmentation and quantification [26]. Underexpression of FERMT2 in the presynaptic chamber led to a decrease in synaptic connectivity, whereas no such effect was observed when underexpressing FERMT2 in the postsynaptic compartment (Fig. 6d). Altogether, our data suggest that FERMT2 expression is required for synapse connectivity. Moreover, PLA-FERMT2/APP signals were colocalized with Synaptophysin and Homer puncta (Fig. 6e), supporting the possibility of the involvement of the FERMT2/APP complex in synapses.

OPEN ACCESS



**Fig. 4** FERMT2 directly interacts with APP. **a** Immunofluorescence images showing the presence of APP and FERMT2 within the axonal growth cone stained with SiR-Actin. The right panel shows the presence of PLA-FERMT2/APP puncta within the axonal growth cone. **b** Impact of lentiviral transduction of nontargeting shRNA (shNT) or shRNA against FERMT2 (shFERMT2) on growth cone area, angular dispersion and speed of the actin-retrograde flow, and APP immunostaining. **c** Co-IP between endogenous APP and FERMT2 from membrane extracts of hippocampal PNC. Protein extracts were incubated with beads only, a mouse (Ms) antibody against APP (4G8), or a nonrelevant (NR) antibody. **d** APP pull-down experiment with wild-

type (WT) or mutated (QW) FERMT2. Protein extracts from HeLa cells overexpressing FERMT2<sup>WT</sup> or FERMT2<sup>QW</sup> were incubated with recombinant APP C-terminal fragment (C100). **e** The domain organization of FERMT2 protein (upper panel). Q614A/W615A (QW) mutation was reported to abolish the interaction of F3 domain of FERMT2 with the NxTY motif. The structural model of the FERMT2-APP complex (lower panel) was built by homology using the crystal structure of the FERMT2-Integrin- $\beta$ 3-tail complex [32]. **f** The impact of FERMT2 on APP metabolism in HEK293-APP<sup>695WT</sup> cells is reverted with the overexpression of FERMT2<sup>QW</sup> compared to FERMT2<sup>WT</sup>. Scale bar = 5  $\mu$ m. Mann-Whitney test; \* $p < 0.05$ .

#### FERMT2 expression regulates synaptic plasticity in an APP-dependent manner

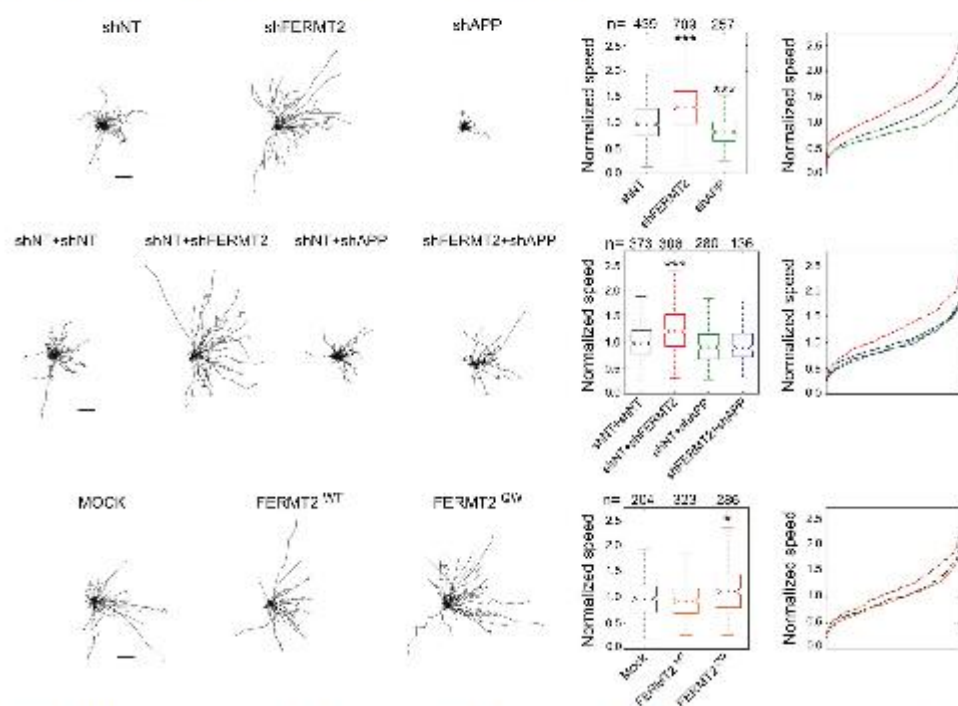
We sought to establish the functional impact of FERMT2 and/or APP silencing on PPF and LTP in *ex vivo* mouse (10-week-old male) hippocampal slices, after stereotaxic lentivirus injection allowing for the expression of shNT, shFERMT2, shAPP, or shFERMT2+shAPP.

Broadly speaking, PPF arises due to increased presynaptic  $Ca^{2+}$ , which leads to the release of neurotransmitter in two distinct waves. In this situation, two action potentials in the presynaptic cell produce two excitatory postsynaptic potentials (EPSPs) in the postsynaptic cell: the first action potential produces the first EPSP, but the second action potential produces an EPSP that is larger than the EPSP produced by the first. PPF modulation therefore highlights a modulation in presynaptic neurotransmitter release [34]. Using this readout

as a proxy for presynaptic function, we observed a significant decrease in PPF in shFERMT2-infected mice compared to shNT-infected control mice (Fig. 7a). This PPF impairment however was rescued when APP was also downregulated (shAPP+shFERMT2 group).

In separate experiments, tetanic stimulation was delivered to the Shaffer collaterals (SC) in order to induce LTP in hippocampal slices (Fig. 7b). Tetanic stimulation of the SC resulted in a robust, long-lasting potentiation of the fEPSP slope in slices from mice infected with shNT and with shAPP, whereas LTP was impaired in slices from shFERMT2-infected mice. This suggests that an LTP deficit was observed in hippocampal slices infected with shFERMT2, but not in those infected with shAPP (Fig. 7c, d). Remarkably, this deficit was abolished when both APP and FERMT2 were silenced, suggesting that APP was required for the molecular mechanism by which FERMT2 impacts LTP.

#### DISCUSSION



**Fig. 5 FERMT2 regulates axonal growth rate depending on APP expression.** Impact of lentiviral transduction on axonal growth speed. Individual axon tracks from a representative set are plotted. Scale bar = 50  $\mu$ m. Box plots and cumulative-distribution plots are color-

matched. *n* is the number of axons analyzed from at least three independent experiments. Kruskal–Wallis ANOVA with multiple comparisons; \**p* < 5 × 10<sup>-2</sup>; \*\*\**p* < 5 × 10<sup>-7</sup>.

Importantly, in these slices, no significant difference was observed for the normalized average slope of the evoked fEPSP, indicating that no alteration of the CA1 basal synaptic transmission occurred in any of the groups analyzed (Fig. 7e and Supplementary Fig. 7).

Altogether, these data are in agreement with our previous observations that FERMT2 is involved in the presynaptic compartment and modulates synaptic connectivity in an APP-dependent manner.

**Discussion**

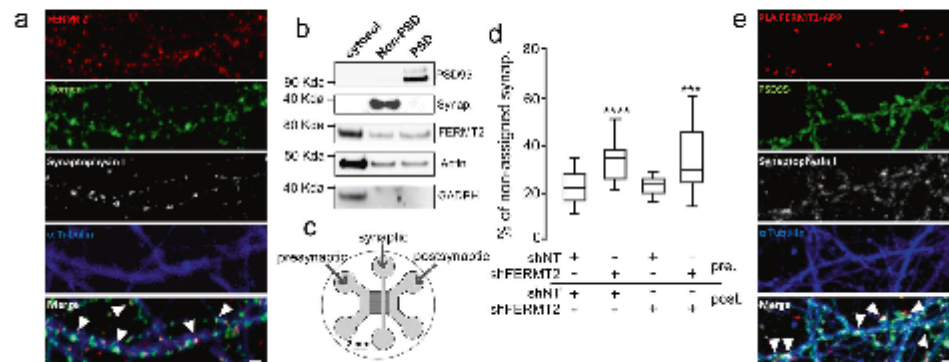
As in other multifactorial diseases, GWAS in AD are agnostic approaches, and how a genetic risk factor is implicated in pathophysiological processes is typically unknown. Sometimes, even the physiological functions of an AD genetic risk factor in the brain are not known. Understanding the role of these genes is thus a challenge that requires several key questions to be addressed: (i) does

the corresponding protein interact (directly or indirectly) with other key players and pathways known to be involved in AD? (ii) What is (are) the functional variant(s) responsible for the GWAS signal and does this (do these) variant(s) impact the biological function of the corresponding protein and its interaction with key players of AD?

To answer these questions, we developed systematic approaches to determine the genes that are involved in APP metabolism, a major player in AD development. To this end, we had previously developed a HCS, based on the quantification of intracellular APP fragments, to measure the impact of underexpression of 18,107 genes (via siRNA pools) on APP metabolism [14]. In the current study, we screened the impact of the overexpression of 2555 miRNAs on APP metabolism with the hypothesis that genes (i) that modulate the APP metabolism and (ii) whose expression levels are regulated by miRNAs that also modulate the APP metabolism are likely some of the key actors controlling the APP metabolism and functions. The convergence of these two agnostic screens highlighted FERMT2, a GWAS-defined genetic risk

FRONTIERS IN GENETICS





**Fig. 6** FERMT2 is present at the synapse and controls synaptic connectivity. **a** Immunofluorescence in hippocampal primary neuronal culture showing the colocalization of FERMT2 puncta with pre- and postsynaptic markers, Synaptophysin and Homer, respectively. **b** Synaptic fractionation experiment revealed the presence of FERMT2 in both pre- and postsynaptic compartments. **c** Schematics of the tri-compartmental microfluidic device. The use of microchannels with different lengths ensures that only axons arrive from the presynaptic to the synaptic compartment, where synapses can be observed

independently of the cell bodies. The device also permits lentiviral transductions to be performed exclusively in the pre- and postsynaptic compartments. **d** Synaptic connectivity as a function of FERMT2 underexpression in pre- and postsynaptic chambers. Increased fraction of Synaptophysin spots not assigned by a Homer spot within a distance threshold of 1  $\mu\text{m}$  is indicative of decreased synaptic connectivity. **e** PLA-FERMT2/APP puncta were observed at the synapses stained for pre- and postsynaptic markers. Scale bar = 2  $\mu\text{m}$ .

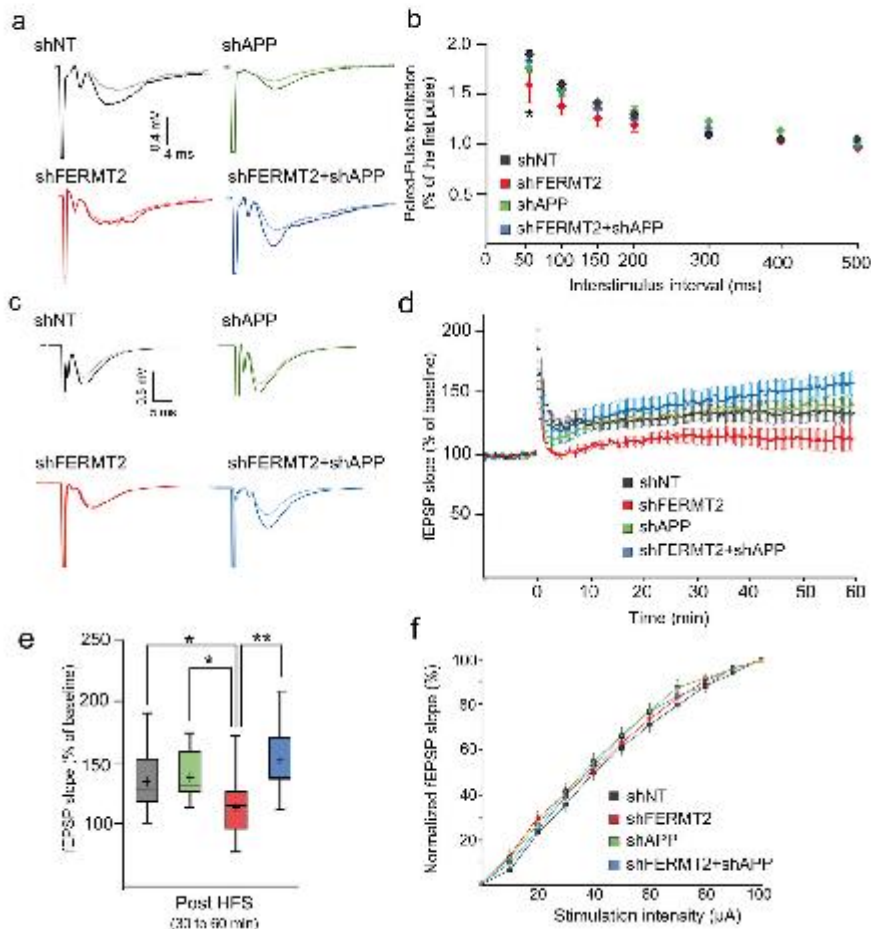
factor of AD, for which almost nothing is known in the cerebral and AD contexts.

We demonstrated that a direct interaction between FERMT2 and APP—through the F3 domain of FERMT2 and the NxTY motif within APP's intracellular domain—is necessary for FERMT2 to have an impact on APP metabolism. Moreover, we observed that the FERMT2/APP interaction could be involved in the regulation of axonal growth, in line with APP's function within the growth cone [30] (data we replicated in this study). It has been reported that FERMT2 is required for the recruitment and activation of focal adhesion kinase and the triggering of integrin signaling [15]. In neurons, the focal adhesion pathway is involved in synaptic density and activity through regulating the dendritic spine shape, stability, and the signaling machinery therein [35]. That is why we also analyzed synaptic plasticity, a readout highly relevant to AD, where synaptic dysfunction/loss is one of the earliest events observed. FERMT2 underexpression had detrimental effects on PPF (presynaptic) and LTP (postsynaptic). Remarkably, in both cases, the detrimental effect of FERMT2 underexpression was dependent on APP expression. In this context, it is important to note that numerous evidence indicate that presynaptic physiological functions involving APP, which has been recently proposed as a structural and functional regulator of the hippocampal presynaptic active zone [36], could be major molecular players in AD [37]. As FERMT2 silencing leads to an accumulation of full-length APP and all its by-products (including A $\beta$  peptides), we can

hypothesize that these accumulations could be involved in the synaptic dysfunction observed due to FERMT2 underexpression, although further experiments are needed to decipher the potential causal link between FERMT2 and APP, i.e., to determine whether FERMT2 impacts the function of full-length APP or invokes A $\beta$  synaptotoxicity. This is of particular interest, since APP shedding strongly enhances its cell adhesion and synaptogenic activity [38]. Moreover, APP's intracellular domain is required for normal synaptic morphology and plasticity, suggesting that its intracellular interaction partners could be required for proper synaptic function [39]. Remarkably, we have recently proposed a circular model of AD pathogenesis, where the core of the focal adhesion pathway—in which FERMT2 and APP are part of—may participate in the dysfunction of synaptic plasticity in AD [13].

We have also identified that FERMT2 expression level is highly regulated by miRNAs that could be preferentially expressed in neurons. In addition, we previously identified the rs7143400 variant located in FERMT2 3'UTR to be susceptible to alter a binding site for miR-4504 [27]. Here, in addition to in silico prediction suggesting the impact of this variant on miRNA binding (Supplementary Fig. 4), we demonstrate that this variant is functional: the AD-associated rs7143400-T allele downregulates FERMT2 and modulates APP metabolism via its interaction with miR-4504. Remarkably, we observed that miR-4504 is overexpressed in the brains of AD cases compared to controls, and is mainly expressed in neurons in primary mixed hippocampal cultures.

## REFERENCES



**Fig. 7** FERMT2 underexpression alters PPF and LTP in an APP-dependent manner. **a** Paired-pulse facilitation (PPF) as a function of the interstimulus interval 7 days after viral injection of indicated lentivirus.  $n = 3$  mice, 2 slices per animal. **b** Exemplary fEPSP traces during baseline (light line) and 30–60 min after LTP induction (dark line). **c** Time course of the average slope of elicited fEPSP responses following LTP induction by a tetanic stimulation protocol in hippocampal CA1 synapses after viral injection. Time point 0 represents the delivery of the tetanic stimulation. Slopes of each fEPSP are

normalized by the baseline and plotted against time. **d** Box plots of the average slope response during 30–60 min post LTP induction. HFS high-frequency stimulation.  $n = 5$  mice, two slices per animal. **e** Normalized average slope of fEPSP evoked in hippocampal slices from animals injected with the indicated lentivirus. Recordings have been performed in the stratum radiatum of hippocampal CA1 region with electrical stimulation of Schaffer collaterals (see “Methods”). Unpaired  $t$  test; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ .

Together, our data indicate that a deleterious overexpression of miR-4504 can lead to a decrease in FERMT2 expression in individuals bearing the rs7143400 minor T allele, which subsequently modulates APP metabolism. Interestingly, similar mechanism has been reported for genetic variants associated with AD risk in APP 3'UTR that regulates APP expression

through miRNA binding [40]. Supporting a link between FERMT2 and APP metabolism, studies from cohorts of patients have reported an association between variants in FERMT2 gene and A $\beta$  in CSF [14] and brain amyloidosis [41].

Here, we propose that FERMT2 downregulation at the earliest stage of AD would depend in part on (i) the miR-4504

FRONTIERS IN GENETICS

expression, (ii) cerebral cell type (i.e., neurons), and (iii) the presence of the rs17143400 minor T allele (observed in 9% of Caucasians). Unfortunately, it is important to keep in mind that all these constraints will make difficult, if not impossible, to detect such a miRNA-dependent decrease in *FERMT2* mRNA levels. Of note, this point may also underline the limitation of expression databases in deciphering the mechanisms underlying the functional effects of GWAS variants, for they do not allow capturing (even hiding) subtle mechanisms.

In publicly available RNA-seq analyses (Mayo Clinic Brain Bank), an overexpression of *FERMT2* mRNA has been observed in postmortem human temporal cortex of AD patients relative to healthy controls [42]. Even though a small sample size did not allow us to observe such a variation in *FERMT2* mRNA levels, we nevertheless detected an increase in *FERMT2* protein levels as a function of Braak stage, especially at later stages (Supplementary Fig. 8). This point is of particular importance since in the Genotype-Tissue Expression Database [43], *FERMT2* variants associated with an increase in AD risk at the genome-wide significance level are also part of an expression quantitative trait locus, significantly associated with decreased brain expression of *FERMT2* mRNA (sentinel variant in GWAS rs17125924;  $-18\%$ ;  $p$  value =  $2 \times 10^{-6}$ ). Altogether, these results strongly support the notion that *FERMT2* downregulation is deleterious at the earliest stages of the disease, whereas *FERMT2* overexpression may occur as a pathological consequence at a later stage. In this context, it would be of interest to further investigate the impact of *FERMT2* downregulation in vivo. Since the loss of *FERMT2* in mice results in embryonic lethality at E7.5 [44], a dedicated mouse model should be developed that allows conditional *FERMT2* knockout in neurons. This model would then be crossed with AD-like mouse models to assess behavioral and AD-associated phenotypes.

In conclusion, we propose that *FERMT2* under-expression through miRNAs and/or genetic regulation leads to synaptic dysfunction in an APP-dependent manner. Our hypothesis may thus call for new therapeutic approaches in AD targeting *FERMT2* and/or APP function.

**Acknowledgements** FE benefited from a doctoral grant co-funded by Hauts-de-France Regional Council and Institut Pasteur de Lille. The authors thank the BICeL and EquipEx ImagInEx HCS platforms of the Institut Pasteur de Lille and Alexandre Vandeputte for technical assistance. The authors thank Karine Biary at the IEMN Lille for the microfabrication work. This work was partly supported by the French RENATECH network. This study was funded by INSERM, Institut Pasteur de Lille, the Centres of Excellence in Neurodegeneration—ANR program (CoEN, GWAS in AD: focus on microRNA), the Canadian Institute of Health Research (CHIR), la Fondation Alzheimer (Syn-Alz), the EU Joint Programme—Neurodegenerative Diseases Research (JPND, 3DMiniBRAIN), and Fondation Vaincre Alzheimer (FR-17006p). This work was also funded by the Lille Métropole Communauté Urbaine and the French government's LABEX DISTALZ program (development of innovative strategies for a

transdisciplinary approach to Alzheimer's disease). This work was supported for MH by Academy of Finland (Grant Number 307866), Sigrid Jusélius Foundation, and the Strategic Neuroscience Funding of the University of Eastern Finland. The authors thank the vectorology platform Transbiomed for lentivirus production.

**Author contributions** J-CL and JC designed and supervised research. AF, FE, FC, and CB performed APP metabolism and *FERMT2*/APP interaction analyses. XH developed the in silico model for *FERMT2*/APP interaction. FE and DK performed and analyzed axon-growth experiments. AC, AF, JD, and JC developed Crispr/Cas9 model and/or performed subsequent analyses. CD, A-CV, AF, and BG-B designed and/or performed miRNA screening and/or statistical analyses. SH and MP performed and analyzed electrophysiology experiments. AF, TM, FD, and SD performed primary neuronal cultures. MM, MT, IP, and MH analyzed transcriptomic and/or proteomic data of *FERMT2* expression in brains. EB and SSH performed miR expression quantification in brains. FE, NM, DK, and JC participated in image acquisition and analyses of APP/*FERMT2* interaction and/or synapse density. FE, PA, JD, DK, J-CL, and JC wrote and/or revised the paper.

### Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** SH and MP are full-time employees of E-Phy-Science SA. CD has been an employee of Janssen Pharmaceutica since her departure from the laboratory Inserm U1167 in 2016.

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

**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 license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license 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 license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

### References

- Checler F. Processing of the beta-amyloid precursor protein and its regulation in Alzheimer's disease. *J Neurochem*. 1995;65:1431–44.
- Hardy J. Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease. *Trends Neurosci*. 1997;20:154–9.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science*. 2002;297:353–6.
- Morris GP, Clark IA, Vissel B. Questions concerning the role of amyloid- $\beta$  in the definition, aetiology and diagnosis of Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 2018;136:663–89.
- Jonsson T, Atwal JK, Steinberg S, Snaedal J, Jonsson PV, Bjornsson S, et al. A mutation in APP protects against Alzheimer's disease and age-related cognitive decline. *Nature*. 2012;488:96–9.
- Nicolas G, Charbonnier C, Wallon D, Quenez O, Bellenger C, Genier-Boley B, et al. SORL1 rare variants: a major risk factor for familial early-onset Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry*. 2016;21:831–6.

REPRODUCTION



7. Andersen OM, Reiche J, Schmidt V, Gotthardt M, Spoelgen R, Behlke J, et al. Neuronal sorting protein-related receptor sortilin/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2005;102:13461-6.
8. Raghavan N, Tosto G. Genetics of Alzheimer's disease: the importance of polygenic and epistatic components. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 2017;17:78.
9. Kim J, Basak JM, Holtzman DM. The role of apolipoprotein E in Alzheimer's disease. *Neuron*. 2009;63:287-303.
10. Jay TR, Hirsch AM, Broihier ML, Miller CM, Neilson LE, Ransohoff RM, et al. Disease progression-dependent effects of TREM2 deficiency in a mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci*. 2017;37:637-47.
11. Jansen IE, Savage JE, Watanabe K, Bryois J, Williams DM, Steinberg S, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new loci and functional pathways influencing Alzheimer's disease risk. *Nat Genet*. 2019;51:404-13.
12. Kunkle BW, Grenier-Boley B, Sims R, Bis JC, Damotte V, Naj AC, et al. Genetic meta-analysis of diagnosed Alzheimer's disease identifies new risk loci and implicates A $\beta$ , tau, immunity and lipid processing. *Nat Genet*. 2019;51:414-30.
13. Douren P, Kilinc D, Malmarche N, Chapuis J, Lambert J-C. The new genetic landscape of Alzheimer's disease: from amyloid cascade to genetically driven synaptic failure hypothesis? *Acta Neuropathol*. 2019;138:221-36.
14. Chapuis J, Flaig A, Grenier-Boley B, Eysen F, Potiez V, Deloison G, et al. Genome-wide, high-content siRNA screening identifies the Alzheimer's genetic risk factor FERMT2 as a major modulator of APP metabolism. *Acta Neuropathol*. 2017;133:955-66.
15. Theodosiou M, Widmaier M, Böttcher RT, Rognoni E, Veelders M, Bharadwaj M, et al. Kindlin-2 cooperates with talin to activate integrins and induces cell spreading by directly binding paxillin. *Elife*. 2016;5:e10130.
16. Dowling JJ, Gibbs E, Russell M, Goldman D, Minarcik J, Golden JA, et al. Kindlin-2 is an essential component of intercalated discs and is required for ventricle cardiac structure and function. *Circ Res*. 2008;102:423-31.
17. Shen Z, Ye Y, Dong L, Vainionpää S, Mustonen H, Puolakkainen P, et al. Kindlin-2: a novel adhesion protein related to tumor invasion, lymph node metastasis, and patient outcome in gastric cancer. *Am J Surg*. 2012;203:222-9.
18. Zhan J, Zhu X, Guo Y, Wang YY, Wang YY, Qiang G, et al. Opposite role of kindlin-1 and kindlin-2 in lung cancers. *PLoS ONE*. 2012;7:1-12.
19. Sossey-Alaoui K, Plaskota E, Szpak D, Plow EF. The Kindlin2-p53-SerpinB2 signaling axis is required for cellular senescence in breast cancer. *Cell Death Dis*. 2019;10:539.
20. Blasiak A, Lee GU, Kilinc D. Neuron subpopulations with different elongation rates and DCC dynamics exhibit distinct responses to isolated Netrin-1 treatment. *ACS Chem Neurosci*. 2015;6:1578-90.
21. Kaech S, Banker G. Culturing hippocampal neurons. *Nat Protoc*. 2006;1:2406-15.
22. Smith PY, Delay C, Gimad J, Papon M-A, Planel E, Sergeant N, et al. MicroRNA-132 loss is associated with tau exon 10 inclusion in progressive supranuclear palsy. *Hum Mol Genet*. 2011;20:4016-24.
23. Sevalle J, Amoyel A, Robert P, Fournié-Zaluski M-C, Roques B, Checler F. Aminopeptidase A contributes to the N-terminal truncation of amyloid beta-peptide. *J Neurochem*. 2009;109:248-56.
24. Meijering E, Dzyubachyk O, Smal I. Methods for cell and particle tracking. *Methods Enzymol*. 2012;504:183-200.
25. Prandemichie ML, De Seranno S, Rush T, Borel E, Elie A, Arnal I, et al. Activity-dependent tau protein translocation to excitatory synapse is disrupted by exposure to amyloid-Beta oligomers. *J Neurosci*. 2014;34:6084-97.
26. Kilinc D, Vzeux A-C, Mendes T, Flaig A, Marques-Coelho D, Verschoore M, et al. Pyk2 overexpression in postsynaptic neurons blocks amyloid  $\beta$ -42-induced synaptotoxicity in microfluidic co-cultures. *Brain Commun*. 2020. <https://doi.org/10.1093/brain/comms/kaal39>.
27. Delay C, Grenier-Boley B, Amoyel P, Dumont J, Lambert J-C. mRNA-dependent target regulation: functional characterization of single-nucleotide polymorphisms identified in genome-wide association studies of Alzheimer's disease. *Alzheimer Res Ther*. 2016;8:20.
28. Sannerud R, Declercq I, Peñic A, Raemaekers T, Menendez G, Zhou L, et al. ADP ribosylation factor 6 (ARF6) controls amyloid precursor protein (APP) processing by mediating the endosomal sorting of BACE1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2011;108:E559-68.
29. Soldano A, Hassan BA. Beyond pathology: APP, brain development and Alzheimer's disease. *Curr Opin Neurobiol*. 2014;27:61-7.
30. Soza LJ, Bergman J, Estrada-Bernal A, Glorioso TJ, Kitzelson JM, Pfenniger KH. Amyloid precursor protein is an autonomous growth cone adhesion molecule engaged in contact guidance. *PLoS ONE*. 2013;8:e64521.
31. Ma Y-Q, Qin J, Wu C, Plow EF. Kindlin-2 (Mig-2): a co-activator of beta3 integrins. *J Cell Biol*. 2008;181:439-46.
32. Li H, Deng Y, Sun K, Yang H, Liu J, Wang M, et al. Structural basis of kindlin-mediated integrin recognition and activation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2017. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703064114>.
33. Taylor AM, Dieterich DC, Ito HT, Kim SA, Schuman EM. Microfluidic local perfusion chambers for the visualization and manipulation of synapses. *Neuron*. 2010;66:57-68.
34. Gebhardt C, Mosienko V, Alenina N, Albrecht D. Priming of LTP in amygdala and hippocampus by prior paired pulse facilitation paradigm in mice lacking brain serotonin. *Hippocampus*. 2019;29:610-8.
35. Hotalainen P, Hoogenraad CC. Actin in dendritic spines: connecting dynamics to function. *J Cell Biol*. 2010;189:619-29.
36. Weingarten J, Weingarten M, Wegner M, Volkhardt W. APP-A novel player within the presynaptic active zone proteome. *Front Mol Neurosci*. 2017;10:43.
37. Barthelet G, Mulle C. Presynaptic failure in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol*. 2020;194:101801.
38. Stahl R, Schilling S, Soha P, Rupp C, Hartmann T, Wagner K, et al. Shedding of APP limits its synaptogenic activity and cell adhesion properties. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:410.
39. Klevanski M, Herrmann U, Weyer SW, Fol R, Carrier N, Wolfert DP, et al. The APP intracellular domain is required for normal synaptic morphology, synaptic plasticity, and hippocampus-dependent behavior. *J Neurosci*. 2015;35:16018-33.
40. Nicolas G, Wallon D, Goupil C, Richard A-C, Potier C, Dorval V, et al. Mutation in the 3' untranslated region of APP as a genetic determinant of cerebral amyloid angiopathy. *Eur J Hum Genet*. 2016;24:92-8.
41. Apostolova LG, Risacher SL, Duran T, Stage EC, Goukasian N, West JD, et al. Associations of the top 20 Alzheimer disease risk variants with brain amyloidosis. *JAMA Neurol*. 2018;75:328.
42. Sullivan SE, Liao M, Smith RV, White C, Lagomarsino VN, Xu J, et al. Candidate-based screening via gene modulation in human neurons and astrocytes implicates FERMT2 in A $\beta$  and TAU proteostasis. *Hum Mol Genet*. 2018. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddy376>.
43. GTEx Consortium KG, Deluca DS, Segre AV, Sullivan TJ, Young TR, Gelfand ET, et al. Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multi-tissue gene regulation in humans. *Science*. 2015;348:648-60.
44. Dowling JJ, Vreede AP, Kim S, Golden J, Feldman EL. Kindlin-2 is required for myocyte elongation and is essential for myogenesis. *BMC Cell Biol*. 2008;9:36.

# BIBLIOGRAPHIE

- Abraham, J-D, S Promé, N Salvétat, L Rubrecht, S Cobo, E Du Paty, P Galéa, et al. 2013. « Cerebrospinal A $\beta$ 11-x and 17-x Levels as Indicators of Mild Cognitive Impairment and Patients' Stratification in Alzheimer's Disease ». *Translational Psychiatry* 3 (7): e281-e281. <https://doi.org/10.1038/tp.2013.58>.
- Acero, Gonzalo, Claudia Garay, David Venegas, Enrique Ortega, et Goar Gevorkian. 2020. « Novel monoclonal antibody 3B8 specifically recognizes pyroglutamate-modified amyloid  $\beta$  3-42 peptide in brain of AD patients and 3xTg-AD transgenic mice ». *Neuroscience Letters* 724 (avril): 134876. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2020.134876>.
- Afram, Elissa, Inger Lauritzen, Alexandre Bourgeois, Wejdane El Manaa, Eric Duplan, Mounia Chami, Audrey Valverde, Bauer Charlotte, Raphaëlle Pardossi-Piquard, et Frederic Checler. 2023. « The  $\eta$ -Secretase-Derived APP Fragment  $\eta$ CTF Is Localized in Golgi, Endosomes and Extracellular Vesicles and Contributes to A $\beta$  Production ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 80 (4): 97. <https://doi.org/10.1007/s00018-023-04737-4>.
- Ahlijanian, Michael K., Nestor X. Barrezueta, Robert D. Williams, Amy Jakowski, Kim P. Kowsz, Sheryl McCarthy, Timothy Coskran, et al. 2000. « Hyperphosphorylated Tau and Neurofilament and Cytoskeletal Disruptions in Mice Overexpressing Human P25, an Activator of Cdk5 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (6): 2910-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.040577797>.
- Ahn, Kwangwook, Christopher C. Shelton, Yuan Tian, Xulun Zhang, M. Lane Gilchrist, Sangram S. Sisodia, et Yue-Ming Li. 2010. « Activation and Intrinsic  $\gamma$ -Secretase Activity of Presenilin 1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (50): 21435-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1013246107>.
- Akbaraly, T. N., F. Portet, S. Fustini, J.-F. Dartigues, S. Artero, O. Rouaud, J. Touchon, K. Ritchie, et C. Berr. 2009. « Leisure Activities and the Risk of Dementia in the Elderly: Results from the Three-City Study ». *Neurology* 73 (11): 854-61. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181b7849b>.
- Akiyama, Haruhiko, Bonnie Bradt, Joachim Bauer, Greg M Cole, Neil R Cooper, Piet Eikelenboom, Mark Emmerling, et al. 2000. « Inflammation and Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging*.
- Alberdi, Elena, M<sup>a</sup> Victoria Sánchez-Gómez, Fabio Cavaliere, Alberto Pérez-Samartín, José Luis Zugaza, Ramón Trullas, María Domercq, et Carlos Matute. 2010. « Amyloid  $\beta$  Oligomers Induce Ca<sup>2+</sup> Dysregulation and Neuronal Death through Activation of Ionotropic Glutamate Receptors ». *Cell Calcium* 47 (3): 264-72. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2009.12.010>.
- Albert, Marilyn S., Steven T. DeKosky, Dennis Dickson, Bruno Dubois, Howard H. Feldman, Nick C. Fox, Anthony Gamst, et al. 2011. « The Diagnosis of Mild Cognitive Impairment Due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia* 7 (3): 270-79. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.008>.
- Alexandru, Anca, Wolfgang Jagla, Sigrid Graubner, Andreas Becker, Christoph Bäuscher, Stephanie Kohlmann, Reinhard Sedlmeier, et al. 2011. « Selective Hippocampal Neurodegeneration in Transgenic Mice Expressing Small Amounts of Truncated A $\beta$  Is Induced by Pyroglutamate-A $\beta$  Formation ». *The Journal of Neuroscience* 31 (36): 12790-801. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1794-11.2011>.
- Alikhani, Nyosha, Lan Guo, Shiqiang Yan, Heng Du, Catarina Moreira Pinho, John Xi Chen, Elzbieta Glaser, et Shirley ShiDu Yan. 2011. « Decreased Proteolytic Activity of the Mitochondrial Amyloid- $\beta$  Degrading Enzyme, PreP Peptidasome, in Alzheimer's Disease Brain

- Mitochondria ». *Journal of Alzheimer's Disease* 27 (1): 75-87. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-101716>.
- Almeida, Claudia G., Reisuke H. Takahashi, et Gunnar K. Gouras. 2006. «  $\beta$ -Amyloid Accumulation Impairs Multivesicular Body Sorting by Inhibiting the Ubiquitin-Proteasome System ». *The Journal of Neuroscience* 26 (16): 4277-88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5078-05.2006>.
- Alves Da Costa, C., C. Sunyach, R. Pardossi-Piquard, J. Sevalle, B. Vincent, N. Boyer, T. Kawarai, N. Girardot, P. St. George-Hyslop, et F. Checler. 2006. « Presenilin-Dependent -Secretase-Mediated Control of P53-Associated Cell Death in Alzheimer's Disease ». *Journal of Neuroscience* 26 (23): 6377-85. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0651-06.2006>.
- Anandatheerthavarada, Hindupur K., Gopa Biswas, Marie-Anne Robin, et Narayan G. Avadhani. 2003. « Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells ». *The Journal of Cell Biology* 161 (1): 41-54. <https://doi.org/10.1083/jcb.200207030>.
- Ancolio, K., C. Dumanchin, H. Barelli, J. M. Warter, A. Brice, D. Campion, T. Frébourg, et F. Checler. 1999. « Unusual Phenotypic Alteration of  $\beta$  Amyloid Precursor Protein ( $\beta$ APP) Maturation by a New Val-715  $\rightarrow$  Met  $\beta$ APP-770 Mutation Responsible for Probable Early-Onset Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (7): 4119-24. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.4119>.
- Ancolio, Karine, Philippe Marambaud, Pascale Dauch, et Frédéric Checler. 1997. «  $\alpha$ -Secretase-Derived Product of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Is Decreased by Presenilin 1 Mutations Linked to Familial Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 69 (6): 2494-99. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.69062494.x>.
- Andersen, Olav M., Nikolaj Bøgh, Anne M. Landau, Gro G. Pløen, Anne Mette G. Jensen, Giulia Monti, Benedicte P. Uthøi, et al. 2022. « A Genetically Modified Minipig Model for Alzheimer's Disease with SORL1 Haploinsufficiency ». *Cell Reports. Medicine* 3 (9): 100740. <https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100740>.
- Andersen, Olav M., Juliane Reiche, Vanessa Schmidt, Michael Gotthardt, Robert Spoelgen, Joachim Behlke, Christine A. F. von Arnim, et al. 2005. « Neuronal sorting protein-related receptor sorLA/LR11 regulates processing of the amyloid precursor protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (38): 13461-66. <https://doi.org/10.1073/pnas.0503689102>.
- Andersen, Olav M., Vanessa Schmidt, Robert Spoelgen, Jørgen Gliemann, Joachim Behlke, Denise Galatis, William J. McKinstry, et al. 2006. « Molecular Dissection of the Interaction between Amyloid Precursor Protein and Its Neuronal Trafficking Receptor SorLA/LR11 ». *Biochemistry* 45 (8): 2618-28. <https://doi.org/10.1021/bi052120v>.
- Andersen, Olav M., et Thomas E. Willnow. 2006. « Lipoprotein Receptors in Alzheimer's Disease ». *Trends in Neurosciences* 29 (12): 687-94. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2006.09.002>.
- Ando, Kunie, Jean-Pierre Brion, Virginie Stygelbout, Valérie Suain, Michèle Authélet, Robert Dedecker, Anaïs Chanut, et al. 2013. « Clathrin Adaptor CALM/PICALM Is Associated with Neurofibrillary Tangles and Is Cleaved in Alzheimer's Brains ». *Acta Neuropathologica* 125 (6): 861-78. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1111-z>.
- Andorfer, Cathy, Christopher M. Acker, Yvonne Kress, Patrick R. Hof, Karen Duff, et Peter Davies. 2005. « Cell-Cycle Reentry and Cell Death in Transgenic Mice Expressing Nonmutant Human Tau Isoforms ». *The Journal of Neuroscience* 25 (22): 5446-54. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4637-04.2005>.
- Andreasen, Niels, et Kaj Blennow. 2005. « CSF biomarkers for mild cognitive impairment and early Alzheimer's disease ». *Clinical Neurology and Neurosurgery* 107 (3): 165-73. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2004.10.011>.

- Anliker, Brigitte, et Ulrike Müller. 2006. « The Functions of Mammalian Amyloid Precursor Protein and Related Amyloid Precursor-like Proteins ». *Neuro-Degenerative Diseases* 3 (4-5): 239-46. <https://doi.org/10.1159/000095262>.
- Anstey, K. J., C. Von Sanden, A. Salim, et R. O'Kearney. 2007. « Smoking as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: A Meta-Analysis of Prospective Studies ». *American Journal of Epidemiology* 166 (4): 367-78. <https://doi.org/10.1093/aje/kwm116>.
- Anstey, Kaarin J., Darren M. Lipnicki, et Lee-Fay Low. 2008. « Cholesterol as a Risk Factor for Dementia and Cognitive Decline: A Systematic Review of Prospective Studies With Meta-Analysis ». *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 16 (5): 343-54. <https://doi.org/10.1097/01.JGP.0000310778.20870.ae>.
- Araki, Wataru, Shinya Saito, Noriko Takahashi-Sasaki, Hirohisa Shiraishi, Hiroto Komano, et Kiyoko S. Murayama. 2006. « Characterization of APH-1 Mutants with a Disrupted Transmembrane GxxxG Motif ». *Journal of Molecular Neuroscience* 29 (1): 35-43. <https://doi.org/10.1385/JMN:29:1:35>.
- Araria-Goumidi, L., J. B. Huguet, J. C. Lambert, B. Frigard, D. Cottel, P. Amouyel, et M. C. Chartier-Harlin. 2002. « No Association of the -48CT Polymorphism of the Presenilin 1 Gene with Alzheimer Disease in a Late-Onset Sporadic Population ». *Journal of Neural Transmission* 109 (7): 1023-27. <https://doi.org/10.1007/s007020200085>.
- Area-Gomez, Estela, Ad J.C. De Groof, Istvan Boldogh, Thomas D. Bird, Gary E. Gibson, Carla M. Koehler, Wai Haung Yu, et al. 2009. « Presenilins Are Enriched in Endoplasmic Reticulum Membranes Associated with Mitochondria ». *The American Journal of Pathology* 175 (5): 1810-16. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2009.090219>.
- Armogida, Marianna, Agnès Petit, Bruno Vincent, Sabine Scarzello, Cristine Alves da Costa, et Frédéric Checler. 2001. « Endogenous  $\beta$ -Amyloid Production in Presenilin-Deficient Embryonic Mouse Fibroblasts ». *Nature Cell Biology* 3 (11): 1030-33. <https://doi.org/10.1038/ncb1101-1030>.
- Arribas, J., L. Coodly, P. Vollmer, T. K. Kishimoto, S. Rose-John, et J. Massagué. 1996. « Diverse Cell Surface Protein Ectodomains Are Shed by a System Sensitive to Metalloprotease Inhibitors ». *The Journal of Biological Chemistry* 271 (19): 11376-82. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.19.11376>.
- Arvanitakis, Zoe, Sue E. Leurgans, Zhenxin Wang, Robert S. Wilson, David A. Bennett, et Julie A. Schneider. 2011. « Cerebral Amyloid Angiopathy Pathology and Cognitive Domains in Older Persons ». *Annals of Neurology* 69 (2): 320-27. <https://doi.org/10.1002/ana.22112>.
- Arvanitakis, Zoe, Robert S. Wilson, Julia L. Bienias, Denis A. Evans, et David A. Bennett. 2004. « Diabetes Mellitus and Risk of Alzheimer Disease and Decline in Cognitive Function ». *Archives of Neurology* 61 (5): 661-66. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.5.661>.
- Asai, Masashi, Chinatsu Hattori, Beáta Szabó, Noboru Sasagawa, Kei Maruyama, Sei-ichi Tanuma, et Shoichi Ishiura. 2003. « Putative Function of ADAM9, ADAM10, and ADAM17 as APP - Secretase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 301 (1): 231-35. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02999-6](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02999-6).
- Athan, Eleni S., Jennifer Williamson, Alejandra Ciappa, Vincent Santana, Stavra N. Romas, Joseph H. Lee, Haydee Rondon, et al. 2001. « A Founder Mutation in Presenilin 1 Causing Early-Onset Alzheimer Disease in Unrelated Caribbean Hispanic Families ». *JAMA* 286 (18): 2257-63. <https://doi.org/10.1001/jama.286.18.2257>.
- Atwood, Craig S, Mark E Obrenovich, Tianbing Liu, Hsien Chan, George Perry, Mark A Smith, et Ralph N Martins. 2003. « Amyloid-b: A Chameleon Walking in Two Worlds: A Review of the Trophic and Toxic Properties of Amyloid-b ». *Brain Research Reviews*.

- Avila, Jesus, Jose J. Lucas, Mar Perez, et Felix Hernandez. 2004. « Role of Tau Protein in Both Physiological and Pathological Conditions ». *Physiological Reviews* 84 (2): 361-84. <https://doi.org/10.1152/physrev.00024.2003>.
- Avramopoulos, Dimitrios. 2009. « Genetics of Alzheimer's Disease: Recent Advances ». *Genome Medicine* 1 (3): 34. <https://doi.org/10.1186/gm34>.
- Axe, Elizabeth L., Simon A. Walker, Maria Manifava, Priya Chandra, H. Llewelyn Roderick, Anja Habermann, Gareth Griffiths, et Nicholas T. Ktistakis. 2008. « Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum ». *The Journal of Cell Biology* 182 (4): 685-701. <https://doi.org/10.1083/jcb.200803137>.
- Baba, Atsushi, Kazuhiko Mitsumori, Maki K. Yamada, Nobuyoshi Nishiyama, Norio Matsuki, et Yuji Ikegaya. 2003. «  $\beta$ -Amyloid Prevents Excitotoxicity via Recruitment of Glial Glutamate Transporters ». *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 368 (3): 234-38. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0792-6>.
- Baek, Sung Hee, Kenneth A. Ohgi, David W. Rose, Edward H. Koo, Christopher K. Glass, et Michael G. Rosenfeld. 2002. « Exchange of N-CoR Corepressor and Tip60 Coactivator Complexes Links Gene Expression by NF- $\kappa$ B and  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein ». *Cell* 110 (1): 55-67. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(02\)00809-7](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(02)00809-7).
- Bai, Xiao-chen, Chuangye Yan, Guanghui Yang, Peilong Lu, Dan Ma, Linfeng Sun, Rui Zhou, Sjors H. W. Scheres, et Yigong Shi. 2015. « An Atomic Structure of Human  $\gamma$ -Secretase ». *Nature* 525 (7568): 212-17. <https://doi.org/10.1038/nature14892>.
- Bailey, Jason A., Bryan Maloney, Yuan-Wen Ge, et Debomoy K. Lahiri. 2011. « Functional Activity of the Novel Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide Interacting Domain (A $\beta$ ID) in the APP and BACE1 Promoter Sequences and Implications in Activating Apoptotic Genes and in Amyloidogenesis ». *Gene* 488 (1-2): 13-22. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.017>.
- Bales, Kelly R., Tatyana Verina, Richard C. Dodel, Yansheng Du, Larry Altstiel, Mark Bender, Paul Hyslop, et al. 1997. « Lack of Apolipoprotein E Dramatically Reduces Amyloid  $\beta$ -Peptide Deposition ». *Nature Genetics* 17 (3): 263-64. <https://doi.org/10.1038/ng1197-263>.
- Ballard, Clive, Serge Gauthier, Anne Corbett, Carol Brayne, Dag Aarsland, et Emma Jones. 2011. « Alzheimer's disease ». *The Lancet* 377 (9770): 1019-31. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61349-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61349-9).
- Bandyopadhyay, Urmi, Sunandini Sridhar, Susmita Kaushik, Roberta Kiffin, et Ana Maria Cuervo. 2010. « NOVEL REGULATORS OF CHAPERONE-MEDIATED AUTOPHAGY ». *Molecular cell* 39 (4): 535-47. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.004>.
- Banks, William A, Jonathan B Jaspan, Weitao Huang, et Abba J Kastin. 1997. « Transport of Insulin Across the Blood-Brain Barrier: Saturability at Euglycemic Doses of Insulin ». *Peptides* 18 (9): 1423-29. [https://doi.org/10.1016/S0196-9781\(97\)00231-3](https://doi.org/10.1016/S0196-9781(97)00231-3).
- Baranger, Kévin, Amandine E. Bonnet, Stéphane D. Girard, Jean-Michel Paumier, Laura García-González, Wejdane Elmanaa, Anne Bernard, et al. 2017. « MT5-MMP Promotes Alzheimer's Pathogenesis in the Frontal Cortex of 5xFAD Mice and APP Trafficking in Vitro ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9 (janvier). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2016.00163>.
- Baranger, Kévin, Yannick Marchalant, Amandine E. Bonnet, Nadine Crouzin, Alex Carrete, Jean-Michel Paumier, Nathalie A. Py, et al. 2016. « MT5-MMP Is a New pro-Amyloidogenic Proteinase That Promotes Amyloid Pathology and Cognitive Decline in a Transgenic Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 73 (1): 217-36. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-1992-1>.
- Barbiero, L, L Benussi, R Ghidoni, A Alberici, C Russo, G Schettini, S.F Pagano, et al. 2003. « BACE-2 Is Overexpressed in Down's Syndrome ». *Experimental Neurology* 182 (2): 335-45. [https://doi.org/10.1016/S0014-4886\(03\)00049-9](https://doi.org/10.1016/S0014-4886(03)00049-9).

- Barger, Steven W., et Ashley D. Harmon. 1997. « Microglial Activation by Alzheimer Amyloid Precursor Protein and Modulation by Apolipoprotein E ». *Nature* 388 (6645): 878-81. <https://doi.org/10.1038/42257>.
- Barnes, Deborah E., et Kristine Yaffe. 2011. « The Projected Effect of Risk Factor Reduction on Alzheimer's Disease Prevalence ». *The Lancet Neurology* 10 (9): 819-28. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(11\)70072-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(11)70072-2).
- Barritt, Joseph D., et John H. Viles. 2015. « Truncated Amyloid- $\beta$ (11-40/42) from Alzheimer Disease Binds  $\text{Cu}^{2+}$  with a Femtomolar Affinity and Influences Fiber Assembly ». *Journal of Biological Chemistry* 290 (46): 27791-802. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.684084>.
- Barritt, Joseph D., Nadine D. Younan, et John H. Viles. 2017. « N-Terminally Truncated Amyloid- $\beta$ (11-40/42) Cofibrillizes with Its Full-Length Counterpart: Implications for Alzheimer's Disease ». *Angewandte Chemie International Edition* 56 (33): 9816-19. <https://doi.org/10.1002/anie.201704618>.
- Bateman, Randall J., Chengjie Xiong, Tammie L.S. Benzinger, Anne M. Fagan, Alison Goate, Nick C. Fox, Daniel S. Marcus, et al. 2012. « Clinical and Biomarker Changes in Dominantly Inherited Alzheimer's Disease ». *New England Journal of Medicine* 367 (9): 795-804. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1202753>.
- Bates, K. A., G. Verdile, Q.-X. Li, D. Ames, P. Hudson, C. L. Masters, et R. N. Martins. 2009. « Clearance Mechanisms of Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Peptide: Implications for Therapeutic Design and Diagnostic Tests ». *Molecular Psychiatry* 14 (5): 469-86. <https://doi.org/10.1038/mp.2008.96>.
- Battistone, M. A., A. Alvau, A. M. Salicioni, P. E. Visconti, V. G. Da Ros, et P. S. Cuasnicu. 2014. « Evidence for the Involvement of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 in Tyrosine Phosphorylation Downstream of Protein Kinase A Activation during Human Sperm Capacitation ». *Molecular Human Reproduction* 20 (11): 1054-66. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau073>.
- Battle, Michele A., Veronica M. Maher, et J. Justin McCormick. 2003. « ST7 Is a Novel Low-Density Lipoprotein Receptor-Related Protein (LRP) with a Cytoplasmic Tail That Interacts with Proteins Related to Signal Transduction Pathways ». *Biochemistry* 42 (24): 7270-82. <https://doi.org/10.1021/bi034081y>.
- Bauer, Joachim, Sylvia Strauss, Benedikt Volk, et Mathias Berger. 1991. « IL-6-Mediated Events in Alzheimer's Disease Pathology ». *Immunology Today* 12 (11): 422. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90148-M](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90148-M).
- Bayer, Thomas A. 2022. « Pyroglutamate A $\beta$  Cascade as Drug Target in Alzheimer's Disease ». *Molecular Psychiatry* 27 (4): 1880-85. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01409-2>.
- Becker-Pauly, Christoph, et Claus U. Pietrzik. 2017. « The Metalloprotease Mepripin  $\beta$  Is an Alternative  $\beta$ -Secretase of APP ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 9. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnmol.2016.00159>.
- Bednarski, Eric, et Gary Lynch. 1996. « Cytosolic Proteolysis of  $\tau$  by Cathepsin D in Hippocampus Following Suppression of Cathepsins B and L ». *Journal of Neurochemistry* 67 (5): 1846-55. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67051846.x>.
- Beecham, Gary W., Kara Hamilton, Adam C. Naj, Eden R. Martin, Matt Huentelman, Amanda J. Myers, Jason J. Corneveaux, et al. 2014. « Genome-Wide Association Meta-Analysis of Neuropathologic Features of Alzheimer's Disease and Related Dementias ». *PLoS Genetics* 10 (9): e1004606. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004606>.
- Beglopoulos, Vassilios, Xiaoyan Sun, Carlos A Saura, Cynthia A. Lemere, Richard D. Kim, et Jie Shen. 2004. « Reduced  $\beta$ -Amyloid Production and Increased Inflammatory Responses in Presenilin Conditional Knock-out Mice\* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (45): 46907-14. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409544200>.



- Behr, D., C. Elle, J. Underwood, J. B. Davis, R. Ward, E. Karran, C. L. Masters, K. Beyreuther, et G. Multhaup. 1999. « Proteolytic Fragments of Alzheimer's Disease-Associated Presenilin 1 Are Present in Synaptic Organelles and Growth Cone Membranes of Rat Brain ». *Journal of Neurochemistry* 72 (4): 1564-73. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1999.721564.x>.
- Behl, Tapan, Ishnoor Kaur, Ovidiu Fratila, Roxana Brata, et Simona Bungau. 2020. « Exploring the Potential of Therapeutic Agents Targeted towards Mitigating the Events Associated with Amyloid- $\beta$  Cascade in Alzheimer's Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 21 (20): 7443. <https://doi.org/10.3390/ijms21207443>.
- Bekris, Lynn M., Chang-En Yu, Thomas D. Bird, et Debby W. Tsuang. 2010. « Review Article: Genetics of Alzheimer Disease ». *Journal of Geriatric Psychiatry and Neurology* 23 (4): 213-27. <https://doi.org/10.1177/0891988710383571>.
- Bell, Robert D, Abhay P Sagare, Alan E Friedman, Gurrinder S Bedi, David M Holtzman, Rashid Deane, et Berislav V Zlokovic. 2007. « Transport Pathways for Clearance of Human Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide and Apolipoproteins E and J in the Mouse Central Nervous System ». *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism* 27 (5): 909-18. <https://doi.org/10.1038/sj.jcbfm.9600419>.
- Bellenguez, Céline, Fahri Küçükali, Iris E. Jansen, Luca Kleideidam, Sonia Moreno-Grau, Najaf Amin, Adam C. Naj, et al. 2022. « New Insights into the Genetic Etiology of Alzheimer's Disease and Related Dementias ». *Nature Genetics* 54 (4): 412-36. <https://doi.org/10.1038/s41588-022-01024-z>.
- Belyaev, Nikolai D., Katherine A. B. Kellett, Caroline Beckett, Natalia Z. Makova, Timothy J. Revett, Natalia N. Nalivaeva, Nigel M. Hooper, et Anthony J. Turner. 2010. « The Transcriptionally Active Amyloid Precursor Protein (APP) Intracellular Domain Is Preferentially Produced from the 695 Isoform of APP in a  $\beta$ -Secretase-Dependent Pathway \* $\blacklozenge$  ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (53): 41443-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.141390>.
- Belyaev, Nikolai D, Natalia N Nalivaeva, Natalia Z Makova, et Anthony J Turner. 2009. « Neprilysin Gene Expression Requires Binding of the Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain to Its Promoter: Implications for Alzheimer Disease ». *EMBO Reports* 10 (1): 94-100. <https://doi.org/10.1038/embor.2008.222>.
- Benilova, Iryna, Eric Karran, et Bart De Strooper. 2012. « The Toxic A $\beta$  Oligomer and Alzheimer's Disease: An Emperor in Need of Clothes ». *Nature Neuroscience* 15 (3): 349-57. <https://doi.org/10.1038/nn.3028>.
- Bennett, Brian D., Safura Babu-Khan, Richard Loeloff, Jean-Claude Louis, Eileen Curran, Martin Citron, et Robert Vassar. 2000. « Expression Analysis of BACE2 in Brain and Peripheral Tissues ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (27): 20647-51. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002688200>.
- Bennett, Rachel E., Sarah L. DeVos, Simon Dujardin, Bianca Corjuc, Rucha Gor, Jose Gonzalez, Allyson D. Roe, et al. 2017. « Enhanced Tau Aggregation in the Presence of Amyloid  $\beta$  ». *The American Journal of Pathology* 187 (7): 1601-12. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2017.03.011>.
- Bentahir, Mostafa, Omar Nyabi, Jan Verhamme, Alexandra Tolia, Katrien Horr , Jens Wiltfang, Hermann Esselmann, et Bart De Strooper. 2006. « Presenilin Clinical Mutations Can Affect  $\gamma$ -Secretase Activity by Different Mechanisms ». *Journal of Neurochemistry* 96 (3): 732-42. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03578.x>.
- Bernstein, H. G., S. Bruszis, D. Schmidt, B. Wiederanders, et A. Dorn. 1989. « Immunodetection of Cathepsin D in Neuritic Plaques Found in Brains of Patients with Dementia of Alzheimer Type ». *Journal Fur Hirnforschung* 30 (5): 613-18.
- Bernstein, Hans-Gert, Alicja Bukowska, Dieter Krell, Bernhard Bogerts, Siegfried Ansorge, et Uwe Lendeckel. 2003. « Comparative Localization of ADAMs 10 and 15 in Human Cerebral Cortex

- Normal Aging, Alzheimer Disease and Down Syndrome ». *Journal of Neurocytology* 32 (2): 153-60. <https://doi.org/10.1023/B:NEUR.0000005600.61844.a6>.
- Berr, Claudine, Marie-Noël Vercambre, et Tasnime N Akbaraly. 2009. « [Epidemiology of Alzheimer's disease: methodological approaches and new perspectives] ».
- Berridge, Michael J. 2014. « Calcium Regulation of Neural Rhythms, Memory and Alzheimer's Disease: Calcium Regulation of Neural Rhythms ». *The Journal of Physiology* 592 (2): 281-93. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.257527>.
- Bertram, L., et R. E. Tanzi. 2009. « Genome-Wide Association Studies in Alzheimer's Disease ». *Human Molecular Genetics* 18 (R2): R137-45. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp406>.
- Bertram, Lars, Christina M. Lill, et Rudolph E. Tanzi. 2010. « The Genetics of Alzheimer Disease: Back to the Future ». *Neuron* 68 (2): 270-81. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.013>.
- Bertrand, Eric, Emmanuel Brouillet, Isabelle Caillé, Colette Bouillot, Greg M. Cole, Alain Prochiantz, et Bernadette Allinquant. 2001. « A Short Cytoplasmic Domain of the Amyloid Precursor Protein Induces Apoptosis In Vitro and In Vivo ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 18 (5): 503-11. <https://doi.org/10.1006/mcne.2001.1030>.
- Beydoun, M. A., H. A. Beydoun, et Y. Wang. 2008. « Obesity and Central Obesity as Risk Factors for Incident Dementia and Its Subtypes: A Systematic Review and Meta-Analysis ». *Obesity Reviews* 9 (3): 204-18. <https://doi.org/10.1111/j.1467-789X.2008.00473.x>.
- Bhaskar, K., G. A. Hobbs, S-H. Yen, et G. Lee. 2010. « Tyrosine Phosphorylation of Tau Accompanies Disease Progression in Transgenic Mouse Models of Tauopathy: Tyrosine-Phosphorylated Tau in Mouse Models ». *Neuropathology and Applied Neurobiology* 36 (6): 462-77. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2990.2010.01103.x>.
- Bhaskar, Kiran, Shu-Hui Yen, et Gloria Lee. 2005. « Disease-related Modifications in Tau Affect the Interaction between Fyn and Tau\* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (42): 35119-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M505895200>.
- Bibl, Mirko, Marion Gallus, Volker Welge, Hermann Esselmann, et Jens Wiltfang. 2012. « Aminoterminally Truncated and Oxidized Amyloid- $\beta$  Peptides in the Cerebrospinal Fluid of Alzheimer's Disease Patients ». *Journal of Alzheimer's Disease* 29 (4): 809-16. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-111796>.
- Bibl, Mirko, Marion Gallus, Volker Welge, Hermann Esselmann, Stefanie Wolf, Eckart R  ther, et Jens Wiltfang. 2012. « Cerebrospinal Fluid Amyloid- $\beta$  2-42 Is Decreased in Alzheimer's, but Not in Frontotemporal Dementia ». *Journal of Neural Transmission* 119 (7): 805-13. <https://doi.org/10.1007/s00702-012-0801-3>.
- . 2018. « Correction to: Cerebrospinal Fluid Amyloid- $\beta$  2-42 Is Decreased in Alzheimer's, but Not in Frontotemporal Dementia ». *Journal of Neural Transmission* 125 (10): 1515-16. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1914-0>.
- Bibl, Mirko, Marion Gallus, Volker Welge, Sabine Lehmann, Katrin Sparbier, Hermann Esselmann, et Jens Wiltfang. 2012. « Characterization of Cerebrospinal Fluid Aminoterminally Truncated and Oxidized Amyloid- $\beta$  Peptides ». *PROTEOMICS - Clinical Applications* 6 (3-4): 163-69. <https://doi.org/10.1002/prca.201100082>.
- Bignall, John. 1993. « APOE Gene Dose in Alzheimer's Disease ». *The Lancet* 342 (8868): 426. [https://doi.org/10.1016/0140-6736\(93\)92824-D](https://doi.org/10.1016/0140-6736(93)92824-D).
- Billings, Lauren M., Salvatore Oddo, Kim N. Green, James L. McGaugh, et Frank M. LaFerla. 2005. « Intraneuronal A $\beta$  Causes the Onset of Early Alzheimer's Disease-Related Cognitive Deficits in Transgenic Mice ». *Neuron* 45 (5): 675-88. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.01.040>.
- Bird, Thomas D. 2008. « Genetic Aspects of Alzheimer Disease ». *Genetics in Medicine* 10 (4): 231-39. <https://doi.org/10.1097/GIM.0b013e31816b64dc>.

- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, et al. 1997. « A Metalloproteinase Disintegrin That Releases Tumour-Necrosis Factor-Alpha from Cells ». *Nature* 385 (6618): 729-33. <https://doi.org/10.1038/385729a0>.
- Blacker, Megan, Mark C. Noe, Thomas J. Carty, Cynthia G. Goodyer, et Andréa C. LeBlanc. 2002. « Effect of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme (TACE) and Metalloprotease Inhibitor on Amyloid Precursor Protein Metabolism in Human Neurons ». *Journal of Neurochemistry* 83 (6): 1349-57. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.01228.x>.
- Bloom, George S. 2014. « Amyloid- $\beta$  and Tau: The Trigger and Bullet in Alzheimer Disease Pathogenesis ». *JAMA Neurology* 71 (4): 505-8. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2013.5847>.
- Blurton-Jones, Mathew, et Frank M. Laferla. 2006. « Pathways by Which Abeta Facilitates Tau Pathology ». *Current Alzheimer Research* 3 (5): 437-48. <https://doi.org/10.2174/156720506779025242>.
- Boehm, Jannic. 2013. « A “Danse Macabre”: Tau and Fyn in STEP with Amyloid Beta to Facilitate Induction of Synaptic Depression and Excitotoxicity ». *The European Journal of Neuroscience* 37 (12): 1925-30. <https://doi.org/10.1111/ejn.12251>.
- Bonifacino, Juan S, et James H Hurley. 2008. « Retromer ». *Current Opinion in Cell Biology* 20 (4): 427-36. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2008.03.009>.
- Bourgeois, Alexandre, Inger Lauritzen, Thomas Lorivel, Charlotte Bauer, Frédéric Checler, et Raphaëlle Pardossi-Piquard. 2018. « Intraneuronal accumulation of C99 contributes to synaptic alterations, apathy-like behavior, and spatial learning deficits in 3 $\times$ TgAD and 2 $\times$ TgAD mice ». *Neurobiology of Aging* 71 (novembre): 21-31. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2018.06.038>.
- Bouter, Caroline, et Yvonne Bouter. 2019. « 18F-FDG-PET in Mouse Models of Alzheimer’s Disease ». *Frontiers in Medicine* 6 (avril): 71. <https://doi.org/10.3389/fmed.2019.00071>.
- Bouter, Yvonne, Katharina Dietrich, Jessica L. Wittnam, Nasrollah Rezaei-Ghaleh, Thierry Pillot, Sophie Papot-Couturier, Thomas Lefebvre, et al. 2013. « N-Truncated Amyloid  $\beta$  (A $\beta$ ) 4-42 Forms Stable Aggregates and Induces Acute and Long-Lasting Behavioral Deficits ». *Acta Neuropathologica* 126 (2): 189-205. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1129-2>.
- Braak, H., et E. Braak. 1991. « Neuropathological Stageing of Alzheimer-Related Changes ». *Acta Neuropathologica* 82 (4): 239-59. <https://doi.org/10.1007/BF00308809>.
- Braulke, Thomas, et Juan S. Bonifacino. 2009. « Sorting of lysosomal proteins ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Lysosomes*, 1793 (4): 605-14. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.10.016>.
- Bretteville, Alexis, et Emmanuel Planel. 2008. « Tau Aggregates: Toxic, Inert, or Protective Species? ». *Journal of Alzheimer’s Disease: JAD* 14 (4): 431-36. <https://doi.org/10.3233/jad-2008-14411>.
- Brickell, Kiri L., Ellen J. Steinbart, Malia Rumbaugh, Haydeh Payami, Gerard D. Schellenberg, Vivianna Van Deerlin, Wuxing Yuan, et Thomas D. Bird. 2006. « Early-Onset Alzheimer Disease in Families With Late-Onset Alzheimer Disease: A Potential Important Subtype of Familial Alzheimer Disease ». *Archives of Neurology* 63 (9): 1307-11. <https://doi.org/10.1001/archneur.63.9.1307>.
- Brouwers, N., K. Sleegers, S. Engelborghs, V. Bogaerts, S. Serneels, K. Kamali, E. Corsmit, et al. 2006. « Genetic Risk and Transcriptional Variability of Amyloid Precursor Protein in Alzheimer’s Disease ». *Brain* 129 (11): 2984-91. <https://doi.org/10.1093/brain/awl212>.
- Brundin, Patrik, Ronald Melki, et Ron Kopito. 2010. « Prion-like Transmission of Protein Aggregates in Neurodegenerative Diseases ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11 (4): 301-7. <https://doi.org/10.1038/nrm2873>.

- Bruzzaniti, Angela, Lynn Neff, Amanda Sandoval, Liping Du, William C. Horne, et Roland Baron. 2009. « Dynamin Reduces Pyk2 Y402 Phosphorylation and Src Binding in Osteoclasts ». *Molecular and Cellular Biology* 29 (13): 3644-56. <https://doi.org/10.1128/MCB.00851-08>.
- Buerger, K., M. Ewers, T. Pirttila, R. Zinkowski, I. Alafuzoff, S. J. Teipel, J. DeBernardis, et al. 2006. « CSF Phosphorylated Tau Protein Correlates with Neocortical Neurofibrillary Pathology in Alzheimer's Disease ». *Brain* 129 (11): 3035-41. <https://doi.org/10.1093/brain/awl269>.
- Bukhari, Hassan, Annika Glotzbach, Katharina Kolbe, Gregor Leonhardt, Christina Loose, et Thorsten Müller. 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 (septembre): 189-213. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.05.005>.
- Burdick, D, B Soreghan, M Kwon, J Kosmoski, M Knauer, A Henschen, J Yates, C Cotman, et C Glabe. 1992. « Assembly and aggregation properties of synthetic Alzheimer's A4/beta amyloid peptide analogs. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (1): 546-54. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)48529-8](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)48529-8).
- Burgaya, Ferran, Andrea Menegon, Mathias Menegoz, Flavia Valtorta, et Jean-Antoine Girault. 1995. « Focal Adhesion Kinase in Rat Central Nervous System ». *European Journal of Neuroscience* 7 (8): 1810-21. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.1995.tb00700.x>.
- Bursavich, Matthew G., Bryce A. Harrison, et Jean-François Blain. 2016. « Gamma Secretase Modulators: New Alzheimer's Drugs on the Horizon? » *Journal of Medicinal Chemistry* 59 (16): 7389-7409. <https://doi.org/10.1021/acs.jmedchem.5b01960>.
- Buttini, Manuel, Matthias Orth, Stefano Bellosta, Hassibullah Akeefe, Robert E. Pitas, Tony Wyss-Coray, Lennart Mucke, et Robert W. Mahley. 1999. « Expression of Human Apolipoprotein E3 or E4 in the Brains of *ApoE*<sup>-/-</sup> Mice: Isoform-Specific Effects on Neurodegeneration ». *The Journal of Neuroscience* 19 (12): 4867-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.19-12-04867.1999>.
- Buxbaum, J D, A A Ruefli, C A Parker, A M Cypess, et P Greengard. 1994. « Calcium Regulates Processing of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor in a Protein Kinase C-Independent Manner. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (10): 4489-93. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.10.4489>.
- Buxbaum, Joseph D, Samuel E Gandy, et Paul Greengard. 1992. « Cholinergic Agonists and Interleukin 1 Regulate Processing and Secretion of the Alzheimer F3/A4 Amyloid Protein Precursor ».
- Buxbaum, Joseph D., Kang-Nian Liu, Yuxia Luo, Jennifer L. Slack, Kim L. Stocking, Jacques J. Peschon, Richard S. Johnson, Beverly J. Castner, Douglas Pat Cerretti, et Roy A. Black. 1998. « Evidence That Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Converting Enzyme Is Involved in Regulated  $\alpha$ -Secretase Cleavage of the Alzheimer Amyloid Protein Precursor ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (43): 27765-67. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.27765>.
- Cabrejo, L., L. Guyant-Marechal, A. Laquerriere, M. Vercelletto, F. De La Fourniere, C. Thomas-Anterion, C. Verny, et al. 2006. « Phenotype Associated with APP Duplication in Five Families ». *Brain* 129 (11): 2966-76. <https://doi.org/10.1093/brain/awl237>.
- Cabrera, Erwin, Paul Mathews, Emiliya Mezhericher, Thomas G. Beach, Jingjing Deng, Thomas A. Neubert, Agueda Rostagno, et Jorge Ghiso. 2018. « A $\beta$  Truncated Species: Implications for Brain Clearance Mechanisms and Amyloid Plaque Deposition ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1864 (1): 208-25. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.07.005>.
- Cacace, Rita, Kristel Slegers, et Christine Van Broeckhoven. 2016. « Molecular genetics of early-onset Alzheimer's disease revisited ». *Alzheimer's & Dementia* 12 (6): 733-48. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2016.01.012>.
- Caglayan, Safak, Anja Bauerfeind, Vanessa Schmidt, Anne-Sophie Carlo, Thaneas Prabakaran, Norbert Hübner, et Thomas E. Willnow. 2012. « Identification of Alzheimer Disease Risk Genotype

- That Predicts Efficiency of SORL1 Expression in the Brain ». *Archives of Neurology* 69 (3): 373-79. <https://doi.org/10.1001/archneuro.2011.788>.
- Caglayan, Safak, Shizuka Takagi-Niidome, Fan Liao, Anne-Sophie Carlo, Vanessa Schmidt, Tilman Burgert, Yu Kitago, et al. 2014. « Lysosomal Sorting of Amyloid- $\beta$  by the SORLA Receptor Is Impaired by a Familial Alzheimer's Disease Mutation ». *Science Translational Medicine* 6 (223): 223ra20-223ra20. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3007747>.
- Cai, Dongming, William J Netzer, Minghao Zhong, Yixin Lin, Guangwei Du, Michael Frohman, David A Foster, et al. 2006. « Presenilin-1 Uses Phospholipase D1 as a Negative Regulator of  $\beta$ -Amyloid Formation ».
- Cai, Xiao-Dan, Todd E. Golde, et Steven G. Younkin. 1993. « Release of Excess Amyloid  $\beta$  Protein from a Mutant Amyloid  $\beta$  Protein Precursor ». *Science* 259 (5094): 514-16. <https://doi.org/10.1126/science.8424174>.
- Caillava, Céline, Sébastien Ranaldi, Inger Lauritzen, Charlotte Bauer, Jeannette Fareh, Jean-Daniel Abraham, et Frédéric Checler. 2014. « Study on A $\beta$ 34 Biology and Detection in Transgenic Mice Brains ». *Neurobiology of Aging* 35 (7): 1570-81. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.01.011>.
- Caillé, Isabelle, Bernadette Allinquant, Edmond Dupont, Colette Bouillot, Andreas Langer, Ulrike Müller, et Alain Prochiantz. 2004. « Soluble Form of Amyloid Precursor Protein Regulates Proliferation of Progenitors in the Adult Subventricular Zone ». *Development* 131 (9): 2173-81. <https://doi.org/10.1242/dev.01103>.
- Calkins, M. J., M. Manczak, P. Mao, U. Shirendeb, et P. H. Reddy. 2011. « Impaired Mitochondrial Biogenesis, Defective Axonal Transport of Mitochondria, Abnormal Mitochondrial Dynamics and Synaptic Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Human Molecular Genetics* 20 (23): 4515-29. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr381>.
- Cam, Judy A, et Guojun Bu. 2006. « Modulation of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Trafficking and Processing by the Low Density Lipoprotein Receptor Family ». *Molecular Neurodegeneration* 1 (1): 8. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-8>.
- Campion, Dominique. 1996. « H6t6rog&kit6 g&Gtique de la maladie d'Alzheimer ».
- Campion, Dominique, Cécile Dumanchin, Didier Hannequin, Bruno Dubois, Serge Belliard, Michèle Puel, Catherine Thomas-Anterion, et al. 1999. « Early-Onset Autosomal Dominant Alzheimer Disease: Prevalence, Genetic Heterogeneity, and Mutation Spectrum ». *The American Journal of Human Genetics* 65 (3): 664-70. <https://doi.org/10.1086/302553>.
- Cao, Xinwei, et Thomas Südhof. 2001. « A Transcriptionally Active Complex of APP with Fe65 and Histone Acetyltransferase Tip60 | Science ». 2001. [https://www.science.org/doi/10.1126/science.1058783?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.science.org/doi/10.1126/science.1058783?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed).
- Cao, Xinwei, et Thomas C. Südhof. 2004. « Dissection of Amyloid- $\beta$  Precursor Protein-Dependent Transcriptional Transactivation ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (23): 24601-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.M402248200>.
- Capell, Anja, Dirk Beher, Stefan Prokop, Harald Steiner, Christoph Kaether, Mark S. Shearman, et Christian Haass. 2005. «  $\gamma$ -Secretase Complex Assembly within the Early Secretory Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (8): 6471-78. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409106200>.
- Capell, Anja, Jürgen Grünberg, Brigitte Pesold, Anke Diehlmann, Martin Citron, Ralph Nixon, Konrad Beyreuther, Dennis J. Selkoe, et Christian Haass. 1998. « The Proteolytic Fragments of the Alzheimer's Disease-Associated Presenilin-1 Form Heterodimers and Occur as a 100–150-kDa Molecular Mass Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (6): 3205-11. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.6.3205>.
- Capell, Anja, Christoph Kaether, Dieter Edbauer, Keiro Shirovani, Sabine Merkl, Harald Steiner, et Christian Haass. 2003. « Nicastrin Interacts with  $\gamma$ -Secretase Complex Components via the N-

- Terminal Part of Its Transmembrane Domain ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (52): 52519-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300435200>.
- Carey, Robyn M, Brigitte A Balcz, Ignacio Lopez-Coviella, et Barbara E Slack. 2005. « Inhibition of Dynamin-Dependent Endocytosis Increases Shedding of the Amyloid Precursor Protein Ectodomain and Reduces Generation of Amyloid  $\beta$  Protein ». *BMC Cell Biology* 6 (1): 30. <https://doi.org/10.1186/1471-2121-6-30>.
- Carmona, Susana, John Hardy, et Rita Guerreiro. 2018. « The Genetic Landscape of Alzheimer Disease ». In *Handbook of Clinical Neurology*, 148:395-408. Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-64076-5.00026-0>.
- Caspersen, Casper, Ning Wang, Jun Yao, Alexander Sosunov, Xi Chen, Joyce W. Lustbader, Hong Wei Xu, David Stern, Guy McKhann, et Shi Du Yan. 2005. « Mitochondrial A $\beta$ : A Potential Focal Point for Neuronal Metabolic Dysfunction in Alzheimer's Disease ». *The FASEB Journal* 19 (14): 2040-41. <https://doi.org/10.1096/fj.05-3735fje>.
- Castano, Eduardo M, Frances Prelli, Thomas Wisniewski, et Blas Frangione. 1995. « Fibrillogenesis in Alzheimer's Disease of Amyloid Peptides and Apolipoprotein E ».
- Castellani, Rudy J., Hyoung-gon Lee, Xiongwei Zhu, George Perry, et Mark A. Smith. 2008. « Alzheimer Disease Pathology As a Host Response ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 67 (6): 523-31. <https://doi.org/10.1097/NEN.0b013e318177eaf4>.
- Castellano, Joseph M., Jungsu Kim, Floy R. Stewart, Hong Jiang, Ronald B. DeMattos, Bruce W. Patterson, Anne M. Fagan, et al. 2011. « Human apoE Isoforms Differentially Regulate Brain Amyloid- $\beta$  Peptide Clearance ». *Science Translational Medicine* 3 (89). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002156>.
- Cataldo, A M, P A Paskevich, E Kominami, et R A Nixon. 1991. « Lysosomal hydrolases of different classes are abnormally distributed in brains of patients with Alzheimer disease. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88 (24): 10998-2.
- Chan, Gail, Charles C White, Phoebe A Winn, Maria Cimpean, Joseph M Replogle, Laura R Glick, Nicole E Cuedon, et al. 2015. « CD33 Modulates TREM2: Convergence of Alzheimer Loci ». *Nature Neuroscience* 18 (11): 1556-58. <https://doi.org/10.1038/nn.4126>.
- Chandu, Dilip, Stacey S. Huppert, et Raphael Kopan. 2006. « Analysis of Transmembrane Domain Mutants Is Consistent with Sequential Cleavage of Notch by  $\gamma$ -Secretase ». *Journal of Neurochemistry* 96 (1): 228-35. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03547.x>.
- Chapuis, J, GERAD consortium, F Hansmannel, M Gistelincq, A Mounier, C Van Cauwenberghe, K V Kolen, et al. 2013. « Increased Expression of BIN1 Mediates Alzheimer Genetic Risk by Modulating Tau Pathology ». *Molecular Psychiatry* 18 (11): 1225-34. <https://doi.org/10.1038/mp.2013.1>.
- Chapuis, Julien, ADGC, Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative, Amandine Flaig, Benjamin Grenier-Boley, Fanny Eysert, Virginie Pottiez, Gaspard Deloison, et al. 2017. « Genome-Wide, High-Content siRNA Screening Identifies the Alzheimer's Genetic Risk Factor FERMT2 as a Major Modulator of APP Metabolism ». *Acta Neuropathologica* 133 (6): 955-66. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1652-z>.
- Chasseigneaux, Stéphanie, et Bernadette Allinquant. 2012. « Functions of A $\beta$ , sAPP $\alpha$  and sAPP $\beta$  : Similarities and Differences ». *Journal of Neurochemistry* 120 (s1): 99-108. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07584.x>.
- Chávez-Gutiérrez, Lucía, Alexandra Tolia, Elke Maes, Tong Li, Philip C. Wong, et Bart de Strooper. 2008. « Glu332 in the Nicastrin Ectodomain Is Essential for  $\gamma$ -Secretase Complex Maturation but Not for Its Activity\* ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (29): 20096-105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M803040200>.



- Checler, Frédéric. 1995. « Processing of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein and Its Regulation in Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 65 (4): 1431-44. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1995.65041431.x>.
- Checler, Frédéric, Elissa Afram, Raphaëlle Pardossi-Piquard, et Inger Lauritzen. 2021. « Is  $\gamma$ -Secretase a Beneficial Inactivating Enzyme of the Toxic APP C-Terminal Fragment C99? » *Journal of Biological Chemistry* 296 (janvier): 100489. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100489>.
- Checler, Frédéric, Cristine Alves Da Costa, Karine Ancolio, Nathalie Chevallier, Elvira Lopez-Perez, et Philippe Marambaud. 2000. « Role of the Proteasome in Alzheimer's Disease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1502 (1): 133-38. [https://doi.org/10.1016/S0925-4439\(00\)00039-9](https://doi.org/10.1016/S0925-4439(00)00039-9).
- Checler, Frédéric, Cristine Alves Da Costa, Cécile Dumanchin-Njock, Elvira Lopez-Perez, Philippe Marambaud, Erwan Paitel, Agnès Petit, et Bruno Vincent. 2002. « Métabolisme du précurseur du peptide amyloïde et présénilines ». *médecine/sciences* 18 (6-7): 717-24. <https://doi.org/10.1051/medsci/20021867717>.
- Checler, Frédéric, Julie Dunys, Raphaelle Pardossi-Piquard, et Cristine Alves da Costa. 2010. « p53 Is Regulated by and Regulates Members of the  $\gamma$ -Secretase Complex ». *Neurodegenerative Diseases* 7 (1-3): 50-55. <https://doi.org/10.1159/000283483>.
- Chen, Fusheng, Hiroshi Hasegawa, Gerold Schmitt-Ulms, Toshitaka Kawarai, Christopher Bohm, Taiichi Katayama, Yongjun Gu, et al. 2006. « TMP21 Is a Presenilin Complex Component That Modulates  $\gamma$ -Secretase but Not  $\epsilon$ -Secretase Activity ». *Nature* 440 (7088): 1208-12. <https://doi.org/10.1038/nature04667>.
- Chen, Jen-Hau, Kun-Pei Lin, et Yen-Ching Chen. 2009. « Risk Factors for Dementia ». *J Formos Med Assoc* 108 (10).
- Cheng, G., C. Huang, H. Deng, et H. Wang. 2012. « Diabetes as a Risk Factor for Dementia and Mild Cognitive Impairment: A Meta-Analysis of Longitudinal Studies: Diabetes and Cognitive Function ». *Internal Medicine Journal* 42 (5): 484-91. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.2012.02758.x>.
- Chételat, G., B. Desgranges, V. de la Sayette, F. Viader, F. Eustache, et J.-C. Baron. 2003. « Mild Cognitive Impairment: Can FDG-PET Predict Who Is to Rapidly Convert to Alzheimer's Disease? » *Neurology* 60 (8): 1374-77. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000055847.17752.e6>.
- Chevallier, Nathalie, Jean Vizzavona, Philippe Marambaud, Claus Peter Baur, Maria Spillantini, Pierre Fulcrand, Jean Martinez, Michel Goedert, Jean-Pierre Vincent, et Frédéric Checler. 1997. « Cathepsin D displays in vitro  $\beta$ -secretase-like specificity ». *Brain Research* 750 (1): 11-19. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(96\)01330-3](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(96)01330-3).
- Cholerton, Brenna, Laura D. Baker, et Suzanne Craft. 2013. « Insulin, Cognition, and Dementia ». *European Journal of Pharmacology* 719 (1-3): 170-79. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.08.008>.
- Christensen, Ditte Z., Thomas Schneider-Axmann, Paul J. Lucassen, Thomas A. Bayer, et Oliver Wirths. 2010. « Accumulation of Intraneuronal A $\beta$  Correlates with ApoE4 Genotype ». *Acta Neuropathologica* 119 (5): 555-66. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0666-1>.
- Cifuentes, Diana, Marine Poittevin, Ekrem Dere, Dong Broquères-You, Philippe Bonnin, Joëlle Benessiano, Marc Pocard, et al. 2015. « Hypertension Accelerates the Progression of Alzheimer-Like Pathology in a Mouse Model of the Disease ». *Hypertension* 65 (1): 218-24. <https://doi.org/10.1161/HYPERTENSIONAHA.114.04139>.
- Cissé, Moustapha Alfa, Claire Sunyach, Solveig Lefranc-Jullien, Rolf Postina, Bruno Vincent, et Frédéric Checler. 2005. « The Disintegrin ADAM9 Indirectly Contributes to the Physiological Processing of Cellular Prion by Modulating ADAM10 Activity \* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (49): 40624-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.M506069200>.

- Citron, M, T S Diehl, A Capell, C Haass, D B Teplow, et D J Selkoe. 1996. « Inhibition of Amyloid  $\beta$ -Protein Production in Neural Cells by the Serine Protease Inhibitor AEBSF ». *Nature* 380 (6583): 691-695. <https://doi.org/10.1038/37600a0>.
- Citron, M., T. Oltersdorf, C. Haass, L. McConlogue, A. Y. Hung, P. Seubert, C. Vigo-Pelfrey, I. Lieberburg, et D. J. Selkoe. 1992. « Mutation of the Beta-Amyloid Precursor Protein in Familial Alzheimer's Disease Increases Beta-Protein Production ». *Nature* 360 (6405): 672-74. <https://doi.org/10.1038/360672a0>.
- Citron, Martin, David B Teplow, et Dennis J Selkoe. 1995. « Generation of amyloid  $\beta$  protein from its precursor is sequence specific ». *Neuron* 14 (3): 661-70. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(95\)90323-2](https://doi.org/10.1016/0896-6273(95)90323-2).
- Citron, Martin, CARMEN VIGO-PELFREYt, David B Teplow, Christine Miller, DALE SCHENKt, JANET JOHNSTONt, Bengt Winblad, NIKOLAOS VENIZELOSt, Lars Lannfelt, et Dennis J Selkoe. 1994. « Excessive Production of Amyloid A $\beta$ -Protein by Peripheral Cells of Symptomatic and Presymptomatic Patients Carrying the Swedish Familial Alzheimer Disease Mutation ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91 (12): 5646-5650. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.12.5646>.
- Cleary, James P., Dominic M. Walsh, Jacki J. Hofmeister, Ganesh M. Shankar, Michael A. Kuskowski, Dennis J. Selkoe, et Karen H. Ashe. 2005. « Natural Oligomers of the Amyloid-Beta Protein Specifically Disrupt Cognitive Function ». *Nature Neuroscience* 8 (1): 79-84. <https://doi.org/10.1038/nn1372>.
- Colciaghi, Francesca, Barbara Borroni, Lucia Pastorino, Elena Marcello, Martina Zimmermann, Flaminio Cattabeni, Alessandro Padovani, et Monica Di Luca. 2002. « [Alpha]-Secretase ADAM10 as Well as [Alpha]APPs Is Reduced in Platelets and CSF of Alzheimer Disease Patients ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 8 (2): 67-74.
- Cole, Sarah L., et Robert Vassar. 2008. « The Role of Amyloid Precursor Protein Processing by BACE1, the  $\beta$ -Secretase, in Alzheimer Disease Pathophysiology ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (44): 29621-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800015200>.
- Conche, Claire, Geneviève Boulla, Alain Trautmann, et Clotilde Randriamampita. 2009. « T Cell Adhesion Primes Antigen Receptor-Induced Calcium Responses through a Transient Rise in Adenosine 3',5'-Cyclic Monophosphate ». *Immunity* 30 (1): 33-43. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2008.10.020>.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, N. J. Risch, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, J. B. Rimmer, et al. 1994. « Protective Effect of Apolipoprotein E Type 2 Allele for Late Onset Alzheimer Disease ». *Nature Genetics* 7 (2): 180-84. <https://doi.org/10.1038/ng0694-180>.
- Corder, E. H., A. M. Saunders, W. J. Strittmatter, D. E. Schmechel, P. C. Gaskell, G. W. Small, A. D. Roses, J. L. Haines, et M. A. Pericak-Vance. 1993. « Gene Dose of Apolipoprotein E Type 4 Allele and the Risk of Alzheimer's Disease in Late Onset Families ». *Science (New York, N.Y.)* 261 (5123): 921-23. <https://doi.org/10.1126/science.8346443>.
- Cordy, Joanna M., Ishrut Hussain, Colin Dingwall, Nigel M. Hooper, et Anthony J. Turner. 2003. « Exclusively targeting  $\beta$ -secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates  $\beta$ -site processing of the amyloid precursor protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (20): 11735-40. <https://doi.org/10.1073/pnas.1635130100>.
- Correia, Sónia C., Renato X. Santos, Cristina Carvalho, Susana Cardoso, Emanuel Candeias, Maria S. Santos, Catarina R. Oliveira, et Paula I. Moreira. 2012. « Insulin Signaling, Glucose Metabolism and Mitochondria: Major Players in Alzheimer's Disease and Diabetes Interrelation ». *Brain Research* 1441 (mars): 64-78. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2011.12.063>.
- Craft, Suzanne, et G Stennis Watson. 2004. « Insulin and Neurodegenerative Disease: Shared and Specific Mechanisms ». *The Lancet Neurology* 3 (3): 169-78. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00681-7](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00681-7).

- Crehan, Helen, Patrick Holton, Selina Wray, Jennifer Pocock, Rita Guerreiro, et John Hardy. 2012. « Complement Receptor 1 (CR1) and Alzheimer's Disease ». *Immunobiology* 217 (2): 244-50. <https://doi.org/10.1016/j.imbio.2011.07.017>.
- Crehan, Helen, Bin Liu, Martin Kleinschmidt, Jens-Ulrich Rahfeld, Kevin X. Le, Barbara J. Caldarone, Jeffrey L. Frost, et al. 2020. « Effector Function of Anti-Pyroglutamate-3 A $\beta$  Antibodies Affects Cognitive Benefit, Glial Activation and Amyloid Clearance in Alzheimer's-like Mice ». *Alzheimer's Research & Therapy* 12 (1): 12. <https://doi.org/10.1186/s13195-019-0579-8>.
- Cruchaga, Carlos, John S.K. Kauwe, Oscar Harari, Sheng Chih Jin, Yefei Cai, Celeste M. Karch, Bruno A. Benitez, et al. 2013. « GWAS of Cerebrospinal Fluid Tau Levels Identifies Risk Variants for Alzheimer's Disease ». *Neuron* 78 (2): 256-68. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.026>.
- Crutcher, K. A., M. A. Clay, S. A. Scott, X. Tian, M. Tolar, et J. A. Harmony. 1994. « Neurite Degeneration Elicited by Apolipoprotein E Peptides ». *Experimental Neurology* 130 (1): 120-26. <https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1191>.
- Cruts, Marc, Hubert Backhovens, Sheng-Yue Wang, Geert Van Gassen, Jessie Theuns, Chris De Jonghe, Anita Wehnert, et al. 1995. « Molecular Genetic Analysis of Familial Early-Onset Alzheimer's Disease Linked to Chromosome 14q24.3 ». *Human Molecular Genetics* 4 (12): 2363-71. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.12.2363>.
- Cruts, Marc, Bart Dermaut, Rosa Rademakers, Gerwin Roks, Marleen Van den Broeck, Gabriela Munteanu, Cornelia M van Duijn, et Christine Van Broeckhoven. 2001. « Amyloid  $\beta$  secretase gene (BACE) is neither mutated in nor associated with early-onset Alzheimer's disease ». *Neuroscience Letters* 313 (1): 105-7. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02234-0](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02234-0).
- Cruts, Marc, Jessie Theuns, et Christine Van Broeckhoven. 2012. « Locus-specific Mutation Databases for Neurodegenerative Brain Diseases ». *Human Mutation* 33 (9): 1340-44. <https://doi.org/10.1002/humu.22117>.
- Cruts, Marc, et Christine Van Broeckhoven. 1998. « Presenilin Mutations in Alzheimer's Disease ». *Human Mutation* 11 (3): 183-90. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(1998\)11:3<183::AID-HUMU1>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(1998)11:3<183::AID-HUMU1>3.0.CO;2-J).
- Cruz e Silva, Edgar F. da, et Odete A. B. da Cruz e Silva. 2003. « Protein Phosphorylation and APP Metabolism ».
- Crystal, Adam S., Vanessa A. Morais, Theodore C. Pierson, Donald S. Pijak, Dan Carlin, Virginia M.-Y. Lee, et Robert W. Doms. 2003. « Membrane Topology of  $\gamma$ -Secretase Component PEN-2 \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (22): 20117-23. <https://doi.org/10.1074/jbc.M213107200>.
- Csiszar, Anna, Zsuzsanna Tucsek, Peter Toth, Danuta Sosnowska, Tripti Gautam, Akos Koller, Ferenc Deak, William E. Sonntag, et Zoltan Ungvari. 2013. « Synergistic effects of hypertension and aging on cognitive function and hippocampal expression of genes involved in  $\beta$ -amyloid generation and Alzheimer's disease ». *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* 305 (8): H1120-30. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00288.2013>.
- Cuccaro, Michael L., Regina M. Carney, Yalun Zhang, Christopher Bohm, Brian W. Kunkle, Badri N. Vardarajan, Patrice L. Whitehead, et al. 2016. « *SORL1* Mutations in Early- and Late-Onset Alzheimer Disease ». *Neurology Genetics* 2 (6): e116. <https://doi.org/10.1212/NXG.000000000000116>.
- Cuesta, Ascensión, Alberto Zambrano, María Royo, et Angel Pascual. 2009. « The Tumour Suppressor P53 Regulates the Expression of Amyloid Precursor Protein (APP) ». *Biochemical Journal* 418 (3): 643-50. <https://doi.org/10.1042/BJ20081793>.
- D'Arrigo, Cristina, Massimo Tabaton, et Angelo Perico. 2009. « N-terminal Truncated Pyroglutamyl  $\beta$  Amyloid Peptide A $\beta$  Py 3-42 Shows a Faster Aggregation Kinetics than the Full-length A $\beta$ 1-42 ». *Biopolymers* 91 (10): 861-73. <https://doi.org/10.1002/bip.21271>.

- Dawkins, Edgar, Rico J.E. Derks, Martina Schifferer, Johannes Trambauer, Edith Winkler, Mikael Simons, Dominik Paquet, Martin Giera, Frits Kamp, et Harald Steiner. 2023. « Membrane Lipid Remodeling Modulates  $\gamma$ -Secretase Processivity ». *Journal of Biological Chemistry* 299 (4): 103027. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.103027>.
- Dawson, G R, G R Seabrook, H Zheng, D W Smith, S Graham, G O'Dowd, B J Bowery, S Boyce, M E Trumbauer, et H Y Chen. 1999. « AGE-RELATED COGNITIVE DEFICITS, IMPAIRED LONG-TERM POTENTIATION AND REDUCTION IN SYNAPTIC MARKER DENSITY IN MICE LACKING THE - AMYLOID PRECURSOR PROTEIN ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (12): 8173-8178. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.12.8173>.
- De Kimpe, Line, Anna Bennis, Rob Zwart, Elise S. Van Haastert, Jeroen J. M. Hoozemans, et Wiep Scheper. 2012. « Disturbed Ca<sup>2+</sup> Homeostasis Increases Glutaminyl Cyclase Expression; Connecting Two Early Pathogenic Events in Alzheimer's Disease In Vitro ». Édité par Koichi M. Iijima. *PLoS ONE* 7 (9): e44674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0044674>.
- De Kimpe, Line, Elise S. Van Haastert, Archontia Kaminari, Rob Zwart, Helma Rutjes, Jeroen J. M. Hoozemans, et Wiep Scheper. 2013. « Intracellular Accumulation of Aggregated Pyroglutamate Amyloid Beta: Convergence of Aging and A $\beta$  Pathology at the Lysosome ». *AGE* 35 (3): 673-87. <https://doi.org/10.1007/s11357-012-9403-0>.
- De La Torre, Jack C. 2004. « Is Alzheimer's Disease a Neurodegenerative or a Vascular Disorder? Data, Dogma, and Dialectics ». *The Lancet Neurology* 3 (3): 184-90. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(04\)00683-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(04)00683-0).
- de la Torre, Jack C. 2012. « Cerebral Hemodynamics and Vascular Risk Factors: Setting the Stage for Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 32 (3): 553-67. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-120793>.
- De Strooper, Bart. 2003. « Aph-1, Pen-2, and Nicastrin with Presenilin Generate an Active Gamma-Secretase Complex ». *Neuron* 38 (1): 9-12. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00205-8](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00205-8).
- . 2010. « Proteases and Proteolysis in Alzheimer Disease: A Multifactorial View on the Disease Process ». *Physiological Reviews* 90 (2): 465-94. <https://doi.org/10.1152/physrev.00023.2009>.
- De Strooper, Bart, et Wim Annaert. 2000. « COMMENTARY: Proteolytic Processing and Cell Biological Functions of the Amyloid Precursor Protein ». *Journal of Cell Science* 113 (11): 1857-70. <https://doi.org/10.1242/jcs.113.11.1857>.
- De Strooper, Bart, Wim Annaert, Philippe Cupers, Paul Saftig, Katleen Craessaerts, Jeffrey S. Mumm, Eric H. Schroeter, et al. 1999. « A Presenilin-1-Dependent  $\gamma$ -Secretase-like Protease Mediates Release of Notch Intracellular Domain ». *Nature* 398 (6727): 518-22. <https://doi.org/10.1038/19083>.
- De Strooper, Bart, et Lucía Chávez Gutiérrez. 2015. « Learning by Failing: Ideas and Concepts to Tackle  $\gamma$ -Secretases in Alzheimer's Disease and Beyond ». *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 55: 419-37. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124309>.
- De Strooper, Bart, Paul Saftig, Katleen Craessaerts, Hugo Vanderstichele, Gundula Guhde, Wim Annaert, Kurt Von Figura, et Fred Van Leuven. 1998. « Deficiency of Presenilin-1 Inhibits the Normal Cleavage of Amyloid Precursor Protein ». *Nature* 391 (6665): 387-90. <https://doi.org/10.1038/34910>.
- De Strooper, Bart, Robert Vassar, et Todd Golde. 2010. « The Secretases: Enzymes with Therapeutic Potential in Alzheimer Disease ». *Nature Reviews Neurology* 6 (2): 99-107. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2009.218>.
- Deane, Rashid, Abhay Sagare, Katie Hamm, Margaret Parisi, Steven Lane, Mary Beth Finn, David M. Holtzman, et Berislav V. Zlokovic. 2008. « apoE Isoform-Specific Disruption of Amyloid  $\beta$  Peptide Clearance from Mouse Brain ». *Journal of Clinical Investigation* 118 (12): 4002-13. <https://doi.org/10.1172/JCI36663>.

- Dekhtyar, Serhiy, Hui-Xin Wang, Kirk Scott, Anna Goodman, Ilona Koupil, et Agneta Herlitz. 2015. « A Life-Course Study of Cognitive Reserve in Dementia—From Childhood to Old Age ». *The American Journal of Geriatric Psychiatry*, Longitudinal Studies, 23 (9): 885-96. <https://doi.org/10.1016/j.jagp.2015.02.002>.
- DeKosky, Steven T., et Stephen W. Scheff. 1990. « Synapse Loss in Frontal Cortex Biopsies in Alzheimer's Disease: Correlation with Cognitive Severity ». *Annals of Neurology* 27 (5): 457-64. <https://doi.org/10.1002/ana.410270502>.
- Delacourte, A., J. P. David, N. Sergeant, L. Buée, A. Wattez, P. Vermersch, F. Ghzali, et al. 1999. « The Biochemical Pathway of Neurofibrillary Degeneration in Aging and Alzheimer's Disease ». *Neurology* 52 (6): 1158-65. <https://doi.org/10.1212/wnl.52.6.1158>.
- Delacourte, André, Nicolas Sergeant, Annick Wattez, Claude-Alain Maurage, Florence Lebert, Florence Pasquier, et Jean-Philippe David. 2002. « Tau Aggregation in the Hippocampal Formation: An Ageing or a Pathological Process? » *Experimental Gerontology* 37 (10-11): 1291-96. [https://doi.org/10.1016/S0531-5565\(02\)00141-9](https://doi.org/10.1016/S0531-5565(02)00141-9).
- Delpont, Alexandre, et Raymond Hewer. 2022. « The Amyloid Precursor Protein: A Converging Point in Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurobiology* 59 (7): 4501-16. <https://doi.org/10.1007/s12035-022-02863-x>.
- DeMattos, Ronald B, John R Cirrito, Maia Parsadanian, Patrick C May, Mark A O'Dell, Jennie W Taylor, Judith A. K Harmony, et al. 2004. « ApoE and Clusterin Cooperatively Suppress A $\beta$  Levels and Deposition: Evidence that ApoE Regulates Extracellular A $\beta$  Metabolism In Vivo ». *Neuron* 41 (2): 193-202. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00850-X](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00850-X).
- DeMattos, Ronald B., Jirong Lu, Ying Tang, Margaret M. Racke, Cindy A. DeLong, John A. Tzaferis, Justin T. Hole, et al. 2012. « A Plaque-Specific Antibody Clears Existing  $\beta$ -amyloid Plaques in Alzheimer's Disease Mice ». *Neuron* 76 (5): 908-20. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2012.10.029>.
- DeMattos, Ronald B., Mark A. O'dell, Maia Parsadanian, Jennie W. Taylor, Judith A. K. Harmony, Kelly R. Bales, Steven M. Paul, Bruce J. Aronow, et David M. Holtzman. 2002. « Clusterin Promotes Amyloid Plaque Formation and Is Critical for Neuritic Toxicity in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10843-48. <https://doi.org/10.1073/pnas.162228299>.
- Derkinderen, Pascal, Julio Siciliano, Madeleine Toutant, et Jean-Antoine Girault. 1998. « Differential Regulation of FAK $\alpha$  and PYK2/Cak $\beta$ , Two Related Tyrosine Kinases, in Rat Hippocampal Slices: Effects of LPA, Carbachol, Depolarization and Hyperosmolarity ». *European Journal of Neuroscience*.
- Di Domenico, Fabio, Antonella Tramutola, et Marzia Perluigi. 2016. « Cathepsin D as a therapeutic target in Alzheimer's disease ». *Expert Opinion on Therapeutic Targets* 20 (12): 1393-95. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1252334>.
- Di Fede, Giuseppe, Marcella Catania, Michela Morbin, Giorgio Giaccone, Maria Luisa Moro, Roberta Ghidoni, Laura Colombo, et al. 2012. « Good Gene, Bad Gene: New APP Variant May Be Both ». *Progress in Neurobiology* 99 (3): 281-92. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.06.004>.
- Di Fede, Giuseppe, Marcella Catania, Michela Morbin, Giacomina Rossi, Silvia Suardi, Giulia Mazzoleni, Marco Merlin, et al. 2009. « A Recessive Mutation in the APP Gene with Dominant-Negative Effect on Amyloidogenesis ». *Science* 323 (5920): 1473-77. <https://doi.org/10.1126/science.1168979>.
- Dice, J. Fred. 2007. « Chaperone-Mediated Autophagy ». *Autophagy* 3 (4): 295-99. <https://doi.org/10.4161/auto.4144>.
- Dickerson, B. C., T. R. Stoub, R. C. Shah, R. A. Sperling, R. J. Killiany, M. S. Albert, B. T. Hyman, D. Blacker, et L. deToledo-Morrell. 2011. « Alzheimer-Signature MRI Biomarker Predicts AD

- Dementia in Cognitively Normal Adults ». *Neurology* 76 (16): 1395-1402.  
<https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3182166e96>.
- Dickerson, Bradford C., et Reisa A. Sperling. 2009. « Large-Scale Functional Brain Network Abnormalities in Alzheimer's Disease: Insights from Functional Neuroimaging ». *Behavioural Neurology* 21 (1-2): 63-75. <https://doi.org/10.1155/2009/610392>.
- Dickson, D. W. 1997. « The Pathogenesis of Senile Plaques ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 56 (4): 321-39. <https://doi.org/10.1097/00005072-199704000-00001>.
- Dietrich, Katharina, Yvonne Bouter, Michael Müller, et Thomas Bayer. 2018. « Synaptic Alterations in Mouse Models for Alzheimer Disease—A Special Focus on N-Truncated Abeta 4-42 ». *Molecules* 23 (4): 718. <https://doi.org/10.3390/molecules23040718>.
- Doan, Andrew, Gopal Thinakaran, David R Borchelt, Hilda H Slunt, Tamara Ratovitsky, Marcia Podlisny, Dennis J Selkoe, et al. 1996. « Protein Topology of Presenilin 1 ». *Neuron* 17 (5): 1023-30. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80232-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80232-9).
- Dodart, Jean-Cosme, Kelly R. Bales, Kimberley S. Gannon, Stephen J. Greene, Ronald B. DeMattos, Chantal Mathis, Cynthia A. DeLong, et al. 2002. « Immunization Reverses Memory Deficits without Reducing Brain Abeta Burden in Alzheimer's Disease Model ». *Nature Neuroscience* 5 (5): 452-57. <https://doi.org/10.1038/nn842>.
- Dodson, Sara E., Olav M. Andersen, Vinit Karmali, Jason J. Fritz, Dongmei Cheng, Junmin Peng, Allan I. Levey, Thomas E. Willnow, et James J. Lah. 2008. « Loss of LR11/SORLA Enhances Early Pathology in a Mouse Model of Amyloidosis: Evidence for a Proximal Role in Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience* 28 (48): 12877-86.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4582-08.2008>.
- Dodson, Sara E., Marla Gearing, Carol F. Lippa, Thomas J. Montine, Allan I. Levey, et James J. Lah. 2006. « LR11/SorLA Expression Is Reduced in Sporadic Alzheimer Disease but Not in Familial Alzheimer Disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 65 (9): 866-72.  
<https://doi.org/10.1097/01.jnen.0000228205.19915.20>.
- Domert, Jakob, Sahana Bhima Rao, Lotta Agholme, Ann-Christin Brorsson, Jan Marcusson, Martin Hallbeck, et Sangeeta Nath. 2014. « Spreading of amyloid- $\beta$  peptides via neuritic cell-to-cell transfer is dependent on insufficient cellular clearance ». *Neurobiology of Disease* 65 (mai): 82-92. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2013.12.019>.
- Domingues, Catarina, Odete A.B. Da Cruz E Silva, et Ana Gabriela Henriques. 2017. « Impact of Cytokines and Chemokines on Alzheimer's Disease Neuropathological Hallmarks ». *Current Alzheimer Research* 14 (8). <https://doi.org/10.2174/1567205014666170317113606>.
- Dominguez, Diana, Jos Tournoy, Dieter Hartmann, Tobias Huth, Kim Cryns, Siska Deforce, Lutgarde Serneels, et al. 2005. « Phenotypic and Biochemical Analyses of BACE1- and BACE2-deficient Mice\* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (35): 30797-806.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M505249200>.
- Doucey, Marie-Agnès, Daniel F. Legler, Mustapha Faroudi, Nicole Boucheron, Petra Baumgaertner, Dieter Naeher, Marek Cebecauer, et al. 2003. « The  $\beta$ 1 and  $\beta$ 3 Integrins Promote T Cell Receptor-mediated Cytotoxic T Lymphocyte Activation\* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (29): 26983-91. <https://doi.org/10.1074/jbc.M302709200>.
- Dourlen, P., F. J. Fernandez-Gomez, C. Dupont, B. Grenier-Boley, C. Bellenguez, H. Obriot, R. Caillierez, et al. 2017. « Functional Screening of Alzheimer Risk Loci Identifies PTK2B as an in Vivo Modulator and Early Marker of Tau Pathology ». *Molecular Psychiatry* 22 (6): 874-83.  
<https://doi.org/10.1038/mp.2016.59>.
- Dourlen, Pierre, Julien Chapuis, et Jean-Charles Lambert. 2018. « Using High-Throughput Animal or Cell-Based Models to Functionally Characterize GWAS Signals ». *Current Genetic Medicine Reports* 6 (3): 107-15. <https://doi.org/10.1007/s40142-018-0141-1>.



- Dourlen, Pierre, Devrim Kilinc, Nicolas Malmanche, Julien Chapuis, et Jean-Charles Lambert. 2019. « The New Genetic Landscape of Alzheimer's Disease: From Amyloid Cascade to Genetically Driven Synaptic Failure Hypothesis? » *Acta Neuropathologica* 138 (2): 221-36. <https://doi.org/10.1007/s00401-019-02004-0>.
- Dries, Daniel R., Sanjiv Shah, Yu-Hong Han, Cong Yu, Sophie Yu, Mark S. Shearman, et Gang Yu. 2009. « Glu-333 of Nicastrin Directly Participates in  $\gamma$ -Secretase Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 284 (43): 29714-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.038737>.
- D'Souza, S.d., K.a. Alinauskas, et J.p. Antel. 1996. « Ciliary Neurotrophic Factor Selectively Protects Human Oligodendrocytes from Tumor Necrosis Factor-Mediated Injury ». *Journal of Neuroscience Research* 43 (3): 289-98. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4547\(19960201\)43:3<289::AID-JNR4>3.0.CO;2-F](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4547(19960201)43:3<289::AID-JNR4>3.0.CO;2-F).
- Du, Jing, Junlei Chang, Songxi Guo, Qing Zhang, et Zhao Wang. 2009. « ApoE 4 reduces the expression of A $\beta$  degrading enzyme IDE by activating the NMDA receptor in hippocampal neurons ». *Neuroscience Letters* 464 (2): 140-45. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2009.07.032>.
- Dubois, Bruno, Howard H. Feldman, Claudia Jacova, Steven T. Dekosky, Pascale Barberger-Gateau, Jeffrey Cummings, André Delacourte, et al. 2007. « Research Criteria for the Diagnosis of Alzheimer's Disease: Revising the NINCDS-ADRDA Criteria ». *The Lancet. Neurology* 6 (8): 734-46. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70178-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70178-3).
- Dumanchin-Njock, Cécile, Cristine Alves Da Costa, Luc Mercken, Laurent Pradier, et Frédéric Checler. 2001. « The Caspase-Derived C-Terminal Fragment of  $\beta$ APP Induces Caspase-Independent Toxicity and Triggers Selective Increase of A $\beta$ 42 in Mammalian Cells ». *Journal of Neurochemistry* 78 (5): 1153-61. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00513.x>.
- Dumanis, Sonya B., Tilman Burgert, Safak Caglayan, Annette Füchtbauer, Ernst-Martin Füchtbauer, Vanessa Schmidt, et Thomas E. Willnow. 2015. « Distinct Functions for Anterograde and Retrograde Sorting of SORLA in Amyloidogenic Processes in the Brain ». *The Journal of Neuroscience* 35 (37): 12703-13. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0427-15.2015>.
- Dunys, Julie, Toshitaka Kawarai, Emilie Giaime, Sherwin Wilk, M. Herrant, P. Auberger, Peter St. George-Hyslop, Cristine Alves da Costa, et Frédéric Checler. 2007. « Study on the Putative Contribution of Caspases and the Proteasome to the Degradation of Aph-1a and Pen-2 ». *Neurodegenerative Diseases* 4 (2-3): 156-63. <https://doi.org/10.1159/000101840>.
- Dunys, Julie, Toshitaka Kawarai, Jean Sevalle, Virginia Dolcini, Peter St. George-Hyslop, Cristine Alves Da Costa, et Frédéric Checler. 2007. « p53-dependent Aph-1 and Pen-2 Anti-apoptotic Phenotype Requires the Integrity of the  $\gamma$ -Secretase Complex but Is Independent of Its Activity\* ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (14): 10516-25. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611572200>.
- Dunys, Julie, Jean Sevalle, Emilie Giaime, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Michael P. Vitek, Paul Renbaum, Ephrat Levy-Lahad, et al. 2009. « p53-dependent control of transactivation of the Pen2 promoter by presenilins ». *Journal of Cell Science* 122 (21): 4003-8. <https://doi.org/10.1242/jcs.051169>.
- Dunys, Julie, Audrey Valverde, et Frédéric Checler. 2018. « Are N- and C-Terminally Truncated A $\beta$  Species Key Pathological Triggers in Alzheimer's Disease? » *Journal of Biological Chemistry* 293 (40): 15419-28. <https://doi.org/10.1074/jbc.R118.003999>.
- Duron, E, et O Hanon. 2008. « Hypertension, Cognitive Decline and Dementia ».
- Edbauer, Dieter, Edith Winkler, Joerg T. Regula, Brigitte Pesold, Harald Steiner, et Christian Haass. 2003. « Reconstitution of  $\gamma$ -Secretase Activity ». *Nature Cell Biology* 5 (5): 486-88. <https://doi.org/10.1038/ncb960>.
- Edwards, Dylan R., Madeleine M. Handsley, et Caroline J. Pennington. 2008. « The ADAM Metalloproteinases ». *Molecular Aspects of Medicine* 29 (5): 258-89. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2008.08.001>.

- Ehehalt, Robert, Beate Michel, Davide De Pietri Tonelli, Daniele Zacchetti, Kai Simons, et Patrick Keller. 2002. « Splice Variants of the B-Site APP-Cleaving Enzyme BACE1 in Human Brain and Pancreas ». *Biochemical and Biophysical Research Communications*.
- El-Deiry, Wafik S., Scott E. Kern, Jennifer A. Pietenpol, Kenneth W. Kinzler, et Bert Vogelstein. 1992. « Definition of a Consensus Binding Site for P53 ». *Nature Genetics* 1 (1): 45-49. <https://doi.org/10.1038/ng0492-45>.
- Elshourbagy, N A, W S Liao, R W Mahley, et J M Taylor. 1985. « Apolipoprotein E mRNA Is Abundant in the Brain and Adrenals, as Well as in the Liver, and Is Present in Other Peripheral Tissues of Rats and Marmosets. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (1): 203-7. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.1.203>.
- Endres, Kristina, Andreas Anders, Elzbieta Kojro, Sandra Gilbert, Falk Fahrenholz, et Rolf Postina. 2003. « Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme Is Processed by Proprotein-Convertases to Its Mature Form Which Is Degraded upon Phorbol Ester Stimulation ». *European Journal of Biochemistry* 270 (11): 2386-93. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2003.03606.x>.
- Esch, F. S., P. S. Keim, E. C. Beattie, R. W. Blacher, A. R. Culwell, T. Oltersdorf, D. McClure, et P. J. Ward. 1990. « Cleavage of Amyloid Beta Peptide during Constitutive Processing of Its Precursor ». *Science (New York, N.Y.)* 248 (4959): 1122-24. <https://doi.org/10.1126/science.2111583>.
- Esler, William P., W. Taylor Kimberly, Beth L. Ostaszewski, Wenjuan Ye, Thekla S. Diehl, Dennis J. Selkoe, et Michael S. Wolfe. 2002. « Activity-dependent isolation of the presenilin- $\gamma$ -secretase complex reveals nicastrin and a  $\gamma$  substrate ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (5): 2720-25. <https://doi.org/10.1073/pnas.052436599>.
- European Medicines Agency. 2022. « Withdrawal of application for the marketing authorisation of Aduhelm (aducanumab) ».
- Evrard, Caroline, Pascal Kienlen-Campard, Mathilde Coevoet, Rémi Opsomer, Bernadette Tasiaux, Patricia Melnyk, Jean-Noël Octave, Luc Buée, Nicolas Sergeant, et Valérie Vingtdoux. 2018. « Contribution of the Endosomal-Lysosomal and Proteasomal Systems in Amyloid- $\beta$  Precursor Protein Derived Fragments Processing ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 12 (novembre): 435. <https://doi.org/10.3389/fncel.2018.00435>.
- Eysert, Fanny, Audrey Coulon, Emmanuelle Boscher, Anaïs-Camille Vreulx, Amandine Flaig, Tiago Mendes, Sandrine Hughes, et al. 2021. « Alzheimer's Genetic Risk Factor FERMT2 (Kindlin-2) Controls Axonal Growth and Synaptic Plasticity in an APP-Dependent Manner ». *Molecular Psychiatry* 26 (10): 5592-5607. <https://doi.org/10.1038/s41380-020-00926-w>.
- Fagan, Anne M., Melanie Watson, Maia Parsadanian, Kelly R. Bales, Steven M. Paul, et David M. Holtzman. 2002. « Human and Murine ApoE Markedly Alters A $\beta$  Metabolism before and after Plaque Formation in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Disease* 9 (3): 305-18. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2002.0483>.
- Falkevall, Annelie, Nyosha Alikhani, Shashi Bhushan, Pavel F. Pavlov, Katrin Busch, Kenneth A. Johnson, Therese Eneqvist, Lars Tjernberg, Maria Ankarcrona, et Elzbieta Glaser. 2006. « Degradation of the Amyloid  $\beta$ -Protein by the Novel Mitochondrial Peptidasome, PreP\* $\blacklozenge$  ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (39): 29096-104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M602532200>.
- Farrer, Lindsay A., L. Adrienne Cupples, Jonathan L. Haines, Bradley Hyman, Walter A. Kukull, Richard Mayeux, Richard H. Myers, Margaret A. Pericak-Vance, Neil Risch, et Cornelia M. van Duijn. 1997. « Effects of Age, Sex, and Ethnicity on the Association Between Apolipoprotein E Genotype and Alzheimer Disease: A Meta-analysis ». *JAMA* 278 (16): 1349-56. <https://doi.org/10.1001/jama.1997.03550160069041>.

- Farris, Wesley, Stefan Mansourian, Yang Chang, Loren Lindsley, Elizabeth A Eckman, Matthew P Frosch, Christopher B Eckman, Rudolph E Tanzi, et Dennis J Selkoe. 2003. « Insulin-Degrading Enzyme Regulates the Levels of Insulin, Amyloid  $\beta$ -Protein, and the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain in Vivo ». *MEDICAL SCIENCES*.
- Farzan, Michael, Christine E. Schnitzler, Natalya Vasilieva, Doris Leung, et Hyeryun Choe. 2000. « BACE2, a  $\beta$ -secretase homolog, cleaves at the  $\beta$  site and within the amyloid- $\beta$  region of the amyloid- $\beta$  precursor protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (17): 9712-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.160115697>.
- Fassbender, K, M Simons, C Bergmann, et M Stroick. 2001. « Simvastatin Strongly Reduces Levels of Alzheimer's Disease  $\beta$ -Amyloid Peptides A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 in Vitro and in Vivo ».
- Féart, Catherine, Cécilia Samieri, et Pascale Barberger-Gateau. 2010. « Mediterranean diet and cognitive function in older adults ». *Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care* 13 (1): 14-18. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e3283331fe4>.
- Fedele, Ernesto. 2023. « Anti-Amyloid Therapies for Alzheimer's Disease and the Amyloid Cascade Hypothesis ». *International Journal of Molecular Sciences* 24 (19): 14499. <https://doi.org/10.3390/ijms241914499>.
- Fenteany, Gabriel, et Stuart L. Schreiber. 1998. « Lactacystin, Proteasome Function, and Cell Fate\* ». *Journal of Biological Chemistry* 273 (15): 8545-48. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.15.8545>.
- Ferreira, Pricilla Costa, Kamila De Almeida Piai, Angela Maria Magosso Takayanagui, et Susana Inés Segura-Muñoz. 2008. « Aluminum as a Risk Factor for Alzheimer's Disease ». *Revista Latino-Americana de Enfermagem* 16 (1): 151-57. <https://doi.org/10.1590/S0104-11692008000100023>.
- Ferretti, Maria Teresa, Maria Florencia Iulita, Enrica Cavedo, Patrizia Andrea Chiesa, Annemarie Schumacher Dimech, Antonella Santuccione Chadha, Francesca Baracchi, et al. 2018. « Sex Differences in Alzheimer Disease — the Gateway to Precision Medicine ». *Nature Reviews Neurology* 14 (8): 457-69. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0032-9>.
- Filipe Teixeira, Pedro, Catarina Moreira Pinho, Rui M. Branca, Janne Lehtiö, Rodney L. Levine, et Elzbieta Glaser. 2012. « In Vitro Oxidative Inactivation of Human Presequence Protease (hPreP) ». *Free Radical Biology and Medicine* 53 (11): 2188-95. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2012.09.039>.
- Finan, Gina M., Hirokazu Okada, et Tae-Wan Kim. 2011. « BACE1 Retrograde Trafficking Is Uniquely Regulated by the Cytoplasmic Domain of Sortilin ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (14): 12602-16. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.170217>.
- Fiore, Francesca, Nicola Zambrano, Giuseppina Minopoli, Virgilio Donini, Angela Duilio, et Tommaso Russo. 1995. « The Regions of the Fe65 Protein Homologous to the Phosphotyrosine Interaction/Phosphotyrosine Binding Domain of Shc Bind the Intracellular Domain of the Alzheimer's Amyloid Precursor Protein (\*) ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (52): 30853-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.52.30853>.
- Fjorback, Anja W., Matthew Seaman, Camilla Gustafsen, Arnela Mehmedbasic, Suzanne Gokool, Chengbiao Wu, Daniel Militz, et al. 2012. « Retromer Binds the FANSHY Sorting Motif in SorLA to Regulate Amyloid Precursor Protein Sorting and Processing ». *The Journal of Neuroscience* 32 (4): 1467-80. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2272-11.2012>.
- Flammang, Brice, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Jean Sevalle, Delphine Debayle, Anne-Sophie Dabert-Gay, Aurélie Thévenet, Inger Lauritzen, et Frédéric Checler. 2012. « Evidence That the Amyloid- $\beta$  Protein Precursor Intracellular Domain, AICD, Derives From  $\beta$ -Secretase-Generated C-Terminal Fragment ». *Journal of Alzheimer's Disease* 30 (1): 145-53. <https://doi.org/10.3233/JAD-2012-112186>.
- Fortini, Mark E. 2002. «  $\gamma$ -Secretase-Mediated Proteolysis in Cell-Surface-Receptor Signalling ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (9): 673-84. <https://doi.org/10.1038/nrm910>.

- Fortna, Ryan R., Adam S. Crystal, Vanessa A. Morais, Donald S. Pijak, Virginia M.-Y. Lee, et Robert W. Doms. 2004. « Membrane Topology and Nicastrin-Enhanced Endoproteolysis of APH-1, a Component of the  $\gamma$ -Secretase Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (5): 3685-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M310505200>.
- Fox, N. C., E. K. Warrington, P. A. Freeborough, P. Hartikainen, A. M. Kennedy, J. M. Stevens, et M. N. Rossor. 1996. « Presymptomatic Hippocampal Atrophy in Alzheimer's Disease: A Longitudinal MRI Study ». *Brain* 119 (6): 2001-7. <https://doi.org/10.1093/brain/119.6.2001>.
- Fraering, Patrick C., Wenjuan Ye, Matthew J. LaVoie, Beth L. Ostaszewski, Dennis J. Selkoe, et Michael S. Wolfe. 2005. «  $\gamma$ -Secretase Substrate Selectivity Can Be Modulated Directly via Interaction with a Nucleotide-Binding Site \* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (51): 41987-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501368200>.
- Fraering, Patrick C., Wenjuan Ye, Jean-Marc Strub, Georgia Dolios, Matthew J. LaVoie, Beth L. Ostaszewski, Alain van Dorsselaer, Rong Wang, Dennis J. Selkoe, et Michael S. Wolfe. 2004. « Purification and Characterization of the Human  $\gamma$ -Secretase Complex ». *Biochemistry* 43 (30): 9774-89. <https://doi.org/10.1021/bi0494976>.
- Francis, Ross, Garth McGrath, Jianhuan Zhang, David A Ruddy, Mary Sym, Javier Apfeld, Monique Nicoll, et al. 2002. « Aph-1 and Pen-2 Are Required for Notch Pathway Signaling,  $\gamma$ -Secretase Cleavage of  $\beta$ APP, and Presenilin Protein Accumulation ». *Developmental Cell*.
- Freude, S., K. Schilbach, et M. Schubert. 2009. « The Role of IGF-1 Receptor and Insulin Receptor Signaling for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: From Model Organisms to Human Disease ». *Current Alzheimer Research* 6 (3): 213-23. <https://doi.org/10.2174/156720509788486527>.
- Fukumori, A., R. Fluhrer, H. Steiner, et C. Haass. 2010. « Three-Amino Acid Spacing of Presenilin Endoproteolysis Suggests a General Stepwise Cleavage of  $\gamma$ -Secretase-Mediated Intramembrane Proteolysis ». *Journal of Neuroscience* 30 (23): 7853-62. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1443-10.2010>.
- Fukumoto, Hiroaki. 2002. «  $\beta$ -Secretase Protein and Activity Are Increased in the Neocortex in Alzheimer Disease | Dementia and Cognitive Impairment | JAMA Neurology | JAMA Network ». 2002. <https://jamanetwork.com/journals/jamaneurology/fullarticle/782775>.
- Fukumoto, Hiroaki, Douglas L. Rosene, Mark B. Moss, Susan Raju, Bradley T. Hyman, et Michael C. Irizarry. 2004. «  $\beta$ -Secretase Activity Increases with Aging in Human, Monkey, and Mouse Brain ». *The American Journal of Pathology* 164 (2): 719-25.
- Furukawa, Katsutoshi, Steven W. Barger, Eric M. Blalock, et Mark P. Mattson. 1996. « Activation of K<sup>+</sup> Channels and Suppression of Neuronal Activity by Secreted  $\beta$ -Amyloid-Precursor Protein ». *Nature* 379 (6560): 74-78. <https://doi.org/10.1038/379074a0>.
- Furukawa, Katsutoshi, Bryce L. Sopher, Russell E. Rydel, James G. Begley, Dao G. Pham, George M. Martin, Michael Fox, et Mark P. Mattson. 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. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1996.67051882.x>.
- Furusawa, Kotaro, Toshiyuki Takasugi, Yung-Wen Chiu, Yukiko Hori, Taisuke Tomita, Mitsunori Fukuda, et Shin-ichi Hisanaga. 2019. « CD2-Associated Protein (CD2AP) Overexpression Accelerates Amyloid Precursor Protein (APP) Transfer from Early Endosomes to the Lysosomal Degradation Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 294 (28): 10886-99. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.005385>.
- Gakhar-Koppole, Nidhi, Phillip Hundeshagen, Claudia Mandl, Sascha W. Weyer, Bernadette Allinquant, Ulrike Müller, et Francesca Ciccolini. 2008. « Activity Requires Soluble Amyloid Precursor Protein  $\alpha$  to Promote Neurite Outgrowth in Neural Stem Cell-Derived Neurons via

- Activation of the MAPK Pathway ». *European Journal of Neuroscience* 28 (5): 871-82.  
<https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2008.06398.x>.
- Gallwitz, Lisa, Lina Schmidt, André R. A. Marques, Andreas Tholey, Liam Cassidy, Irem Ulku, Gerhard Multhaup, Alessandro Di Spiezio, et Paul Saftig. 2022. « Cathepsin D: Analysis of its potential role as an amyloid beta degrading protease ». *Neurobiology of Disease* 175 (décembre): 105919. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2022.105919>.
- Gatz, Margaret, Chandra A. Reynolds, Laura Fratiglioni, Boo Johansson, James A. Mortimer, Stig Berg, Amy Fiske, et Nancy L. Pedersen. 2006. « Role of Genes and Environments for Explaining Alzheimer Disease ». *Archives of General Psychiatry* 63 (2): 168-74.  
<https://doi.org/10.1001/archpsyc.63.2.168>.
- Genin, E, D Hannequin, D Wallon, K Sleegers, M Hiltunen, O Combarros, M J Bullido, et al. 2011. « APOE and Alzheimer Disease: A Major Gene with Semi-Dominant Inheritance ». *Molecular Psychiatry* 16 (9): 903-7. <https://doi.org/10.1038/mp.2011.52>.
- Gentier, Romina J., et Fred W. Van Leeuwen. 2015. « Misframed Ubiquitin and Impaired Protein Quality Control: An Early Event in Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 8 (septembre). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2015.00047>.
- Gertsik, Natalya, Danica Chiu, et Yueming Li. 2015. « Complex Regulation of gamma-Secretase: from Obligatory to Modulatory Subunits ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 6.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2014.00342>.
- Geula, C., M. M. Mesulam, D. M. Saroff, et C. K. Wu. 1998. « Relationship between Plaques, Tangles, and Loss of Cortical Cholinergic Fibers in Alzheimer Disease ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 57 (1): 63-75. <https://doi.org/10.1097/00005072-199801000-00008>.
- Ghasemi, Rasoul, Ali Haeri, Leila Dargahi, Zahurin Mohamed, et Abolhassan Ahmadiani. 2013. « Insulin in the Brain: Sources, Localization and Functions ». *Molecular Neurobiology* 47 (1): 145-71. <https://doi.org/10.1007/s12035-012-8339-9>.
- Ghosal, Kaushik, Daniel L. Vogt, Man Liang, Yong Shen, Bruce T. Lamb, et Sanjay W. Pimplikar. 2009. « Alzheimer's Disease-like Pathological Features in Transgenic Mice Expressing the APP Intracellular Domain ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106 (43): 18367-72.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.0907652106>.
- Giannakopoulos, P., F. R. Herrmann, T. Bussi re, C. Bouras, E. Kovari, D. P. Perl, J. H. Morrison, G. Gold, et P. R. Hof. 2003. « Tangle and Neuron Numbers, but Not Amyloid Load, Predict Cognitive Status in Alzheimer's Disease ». *Neurology* 60 (9): 1495-1500.  
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000063311.58879.01>.
- Gibson, G. E., V. Haroutunian, H. Zhang, L. C. Park, Q. Shi, M. Lesser, R. C. Mohs, R. K. Sheu, et J. P. Blass. 2000. « Mitochondrial Damage in Alzheimer's Disease Varies with Apolipoprotein E Genotype ». *Annals of Neurology* 48 (3): 297-303.
- Gil-Henn, Hava, Jean-Antoine Girault, et Sima Lev. 2023. « PYK2, a Hub of Signaling Networks in Breast Cancer Progression ». *Trends in Cell Biology* 0 (0).  
<https://doi.org/10.1016/j.tcb.2023.07.006>.
- Gillman, Alan L., Hyunbum Jang, Joon Lee, Srinivasan Ramachandran, Bruce L. Kagan, Ruth Nussinov, et Fernando Teran Arce. 2014. « Activity and Architecture of Pyroglutamate-Modified Amyloid- $\beta$  ( $A\beta_{pE3-42}$ ) Pores ». *The Journal of Physical Chemistry B* 118 (26): 7335-44.  
<https://doi.org/10.1021/jp5040954>.
- Giralt, Albert, Benoit de Pins, Carmen Cifuentes-Díaz, Laura López-Molina, Amel Thamila Farah, Marion Tible, Vincent Deramecourt, et al. 2018. « PTK2B/Pyk2 Overexpression Improves a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Experimental Neurology* 307 (septembre): 62-73.  
<https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2018.05.020>.

- Girault, Jean-Antoine, Alicia Costa, Pascal Derkinderen, Jeanne-Marie Studler, et Madeleine Toutant. 1999. « FAK and PYK2/CAK $\beta$  in the Nervous System: A Link between Neuronal Activity, Plasticity and Survival? »
- Giri, Mohan, Yang Lü, et Man Zhang. 2016. « Genes Associated with Alzheimer's Disease: An Overview and Current Status ». *Clinical Interventions in Aging*, mai, 665. <https://doi.org/10.2147/CIA.S105769>.
- Giuffrida, Maria Laura, Filippo Caraci, Bruno Pignataro, Sebastiano Cataldo, Paolo De Bona, Valeria Bruno, Gemma Molinaro, et al. 2009. «  $\beta$ -Amyloid Monomers Are Neuroprotective ». *The Journal of Neuroscience* 29 (34): 10582-87. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1736-09.2009>.
- Giulian, Dana. 1999. « Microglia and the Immune Pathology of Alzheimer Disease ». *The American Journal of Human Genetics* 65 (1): 13-18. <https://doi.org/10.1086/302477>.
- Glabe, Charles. 2001. « Intracellular Mechanisms of Amyloid Accumulation and Pathogenesis in Alzheimer's Disease ». *Journal of Molecular Neuroscience* 17 (2): 137-45. <https://doi.org/10.1385/JMN:17:2:137>.
- Glener, George G., et Caine W. Wong. 1984. « Alzheimer's Disease: Initial Report of the Purification and Characterization of a Novel Cerebrovascular Amyloid Protein ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 120 (3): 885-90. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(84\)80190-4](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(84)80190-4).
- Golde, Todd E., Steven Estus, Marianne Usiak, Linda H. Younkin, et Steven G. Younkin. 1990. « Expression of  $\beta$  amyloid protein precursor mRNAs: Recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in alzheimer's disease using PCR ». *Neuron* 4 (2): 253-67. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(90\)90100-T](https://doi.org/10.1016/0896-6273(90)90100-T).
- Goldgaber, Dmitry, HERBERT W HARRIST, TIMOTHY HLA $\beta$ , THOMAS MACIAG $\beta$ , Robert J Donnelly, J Steven Jacobsen, Michael P Vitek, et D CARLETON GAJDUSEK $\beta$ . 1989. « Interleukin 1 Regulates Synthesis of Amyloid 8-Protein Precursor mRNA in Human Endothelial Cells ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Goldgaber, Dmitry, Michael I. Lerman, O. Wesley McBride, Umberto Saffiotti, et D. Carleton Gajdusek. 1987. « Characterization and Chromosomal Localization of a cDNA Encoding Brain Amyloid of Alzheimer's Disease ». *Science* 235 (4791): 877-80. <https://doi.org/10.1126/science.3810169>.
- Goldstein, Lawrence S.B. 2012. « Axonal Transport and Neurodegenerative Disease: Can We See the Elephant? » *Progress in Neurobiology* 99 (3): 186-90. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2012.03.006>.
- Gómez-Isla, Teresa, Richard Hollister, Howard West, Stina Mui, John H. Growdon, Ronald C. Petersen, Joseph E. Parisi, et Bradley T. Hyman. 1997. « Neuronal Loss Correlates with but Exceeds Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease: Neuronal Loss in the Superior Temporal Sulcus in Alzheimer's Disease ». *Annals of Neurology* 41 (1): 17-24. <https://doi.org/10.1002/ana.410410106>.
- Gómez-Isla, Teresa, Joseph L. Price, Daniel W. McKeel Jr., John C. Morris, John H. Growdon, et Bradley T. Hyman. 1996. « Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience* 16 (14): 4491-4500. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-14-04491.1996>.
- González-Fernández, Lauro, Beatriz Macías-García, Shavahn C. Loux, Dickson D. Varner, et Katrin Hinrichs. 2013. « Focal Adhesion Kinases and Calcium/Calmodulin-Dependent Protein Kinases Regulate Protein Tyrosine Phosphorylation in Stallion Sperm1 ». *Biology of Reproduction* 88 (6): 138, 1-12. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.112.107078>.
- Goodger, Zoë V., Lawrence Rajendran, Annette Trutzel, Bernhard M. Kohli, Roger M. Nitsch, et Uwe Konietzko. 2009. « Nuclear Signaling by the APP Intracellular Domain Occurs Predominantly



- through the Amyloidogenic Processing Pathway ». *Journal of Cell Science* 122 (20): 3703-14. <https://doi.org/10.1242/jcs.048090>.
- Gosztyla, Maya L., Holly M. Brothers, et Stephen R. Robinson. 2018. « Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Is an Antimicrobial Peptide: A Review of the Evidence ». *Journal of Alzheimer's Disease* 62 (4): 1495-1506. <https://doi.org/10.3233/JAD-171133>.
- Götz, J., F. Chen, J. van Dorpe, et R. M. Nitsch. 2001. « Formation of Neurofibrillary Tangles in P301 Tau Transgenic Mice Induced by Abeta 42 Fibrils ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534): 1491-95. <https://doi.org/10.1126/science.1062097>.
- Gouras, Gunnar K., Claudia G. Almeida, et Reisuke H. Takahashi. 2005. « Intraneuronal A $\beta$  Accumulation and Origin of Plaques in Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 26 (9): 1235-44. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.05.022>.
- Gouras, Gunnar K, Julia Tsai, Jan Naslund, Bruno Vincent, Mark Edgar, Frederic Checler, Jeffrey P Greenfield, et al. 2000. « Intraneuronal A $\beta$ 42 Accumulation in Human Brain » 156 (1).
- Goutte, Caroline, Makoto Tsunozaki, Valerie A. Hale, et James R. Priess. 2002. « APH-1 Is a Multipass Membrane Protein Essential for the Notch Signaling Pathway in *Caenorhabditis Elegans* Embryos ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (2): 775-79. <https://doi.org/10.1073/pnas.022523499>.
- Gralle, Matthias, et Sérgio T. Ferreira. 2007. « Structure and Functions of the Human Amyloid Precursor Protein: The Whole Is More than the Sum of Its Parts ». *Progress in Neurobiology* 82 (1): 11-32. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2007.02.001>.
- Gratuze, Maud, Cheryl E. G. Leyns, et David M. Holtzman. 2018. « New Insights into the Role of TREM2 in Alzheimer's Disease ». *Molecular Neurodegeneration* 13 (1): 66. <https://doi.org/10.1186/s13024-018-0298-9>.
- Greenberg, Steven M., M. Edip Gurol, Jonathan Rosand, et Eric E. Smith. 2004. « Amyloid Angiopathy-Related Vascular Cognitive Impairment ». *Stroke* 35 (11\_suppl\_1): 2616-19. <https://doi.org/10.1161/01.STR.0000143224.36527.44>.
- Greenfield, Jeffrey P, Julia Tsai, Gunnar K Gouras, Bing Hai, Gopal Thinakaran, Frederic Checler, Sangram S Sisodia, Paul Greengard, et Huaxi Xu. 1999. « Endoplasmic Reticulum and Trans-Golgi Network Generate Distinct Populations of Alzheimer  $\beta$ -Amyloid Peptides ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Griciuc, Ana, Alberto Serrano-Pozo, Antonio R. Parrado, Andrea N. Lesinski, Caroline N. Asselin, Kristina Mullin, Basavaraj Hooli, Se Hoon Choi, Bradley T. Hyman, et Rudolph E. Tanzi. 2013. « Alzheimer's Disease Risk Gene CD33 Inhibits Microglial Uptake of Amyloid Beta ». *Neuron* 78 (4): 631-43. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.04.014>.
- Gu, Yongjun, Fusheng Chen, Nobuo Sanjo, Toshitaka Kawarai, Hiroshi Hasegawa, Monica Duthie, Wenping Li, et al. 2003. « APH-1 Interacts with Mature and Immature Forms of Presenilins and Nicastrin and May Play a Role in Maturation of Presenilin-Nicastrin Complexes ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (9): 7374-80. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209499200>.
- Gu, Yongjun, Hiroaki Misonou, Toru Sato, Naoshi Dohmae, Koji Takio, et Yasuo Ihara. 2001. « Distinct Intramembrane Cleavage of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Family Resembling  $\gamma$ -Secretase-like Cleavage of Notch\* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (38): 35235-38. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100357200>.
- Gudala, Kapil, Dipika Bansal, Fabrizio Schifano, et Anil Bhansali. 2013. « Diabetes Mellitus and Risk of Dementia: A Meta-analysis of Prospective Observational Studies ». *Journal of Diabetes Investigation* 4 (6): 640-50. <https://doi.org/10.1111/jdi.12087>.
- Guerreiro, Rita Joao, Miquel Baquero, Rafael Blesa, Mercè Boada, Jose Miguel Brás, Maria J. Bullido, Ana Calado, et al. 2010. « Genetic Screening of Alzheimer's Disease Genes in Iberian and African Samples Yields Novel Mutations in Presenilins and APP ». *Neurobiology of Aging* 31 (5): 725-31. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2008.06.012>.

- Güner, Gökhan, et Stefan F. Lichtenthaler. 2020. « The Substrate Repertoire of  $\gamma$ -Secretase/Presenilin ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 105 (septembre): 27-42. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2020.05.019>.
- Gunn, Adam P., Bruce X. Wong, Timothy Johanssen, James C. Griffith, Colin L. Masters, Ashley I. Bush, Kevin J. Barnham, James A. Duce, et Robert A. Cherny. 2016. « Amyloid- $\beta$  Peptide A $\beta$ 3pE-42 Induces Lipid Peroxidation, Membrane Permeabilization, and Calcium Influx in Neurons ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (12): 6134-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.655183>.
- Guyant-Maréchal, L., A. Rovelet-Lecrux, L. Goumidi, E. Cousin, D. Hannequin, G. Raux, C. Penet, et al. 2007. « Variations in the APP Gene Promoter Region and Risk of Alzheimer Disease ». *Neurology* 68 (9): 684-87. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000255938.33739.46>.
- H. Hook, Vivian Y., Thomas Toneff, Wade Aaron, Sukkid Yasothornsrikul, Richard Bunday, et Terry Reisine. 2002. «  $\beta$ -Amyloid Peptide in Regulated Secretory Vesicles of Chromaffin Cells: Evidence for Multiple Cysteine Proteolytic Activities in Distinct Pathways for  $\beta$ -Secretase Activity in Chromaffin Vesicles ». *Journal of Neurochemistry* 81 (2): 237-56. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00794.x>.
- Haas, Laura T., Santiago V. Salazar, Mikhail A. Kostylev, Ji Won Um, Adam C. Kaufman, et Stephen M. Strittmatter. 2016. « Metabotropic Glutamate Receptor 5 Couples Cellular Prion Protein to Intracellular Signalling in Alzheimer's Disease ». *Brain* 139 (2): 526-46. <https://doi.org/10.1093/brain/awv356>.
- Haas, Laura T., Santiago V. Salazar, Levi M. Smith, Helen R. Zhao, Timothy O. Cox, Charlotte S. Herber, Andrew P. Dignan, et al. 2017. « Silent Allosteric Modulation of mGluR5 Maintains Glutamate Signaling While Rescuing Alzheimer's Mouse Phenotypes ». *Cell Reports* 20 (1): 76-88. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.06.023>.
- Haas, Laura T., et Stephen M. Strittmatter. 2016. « Oligomers of Amyloid  $\beta$  Prevent Physiological Activation of the Cellular Prion Protein-Metabotropic Glutamate Receptor 5 Complex by Glutamate in Alzheimer Disease ». *The Journal of Biological Chemistry* 291 (33): 17112-21. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.720664>.
- Haass, C., C. Kaether, G. Thinakaran, et S. Sisodia. 2012. « Trafficking and Proteolytic Processing of APP ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (5): a006270-a006270. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006270>.
- Haass, C., M. G. Schlossmacher, A. Y. Hung, C. Vigo-Pelfrey, A. Mellon, B. L. Ostaszewski, I. Lieberburg, E. H. Koo, D. Schenk, et D. B. Teplow. 1992. « Amyloid Beta-Peptide Is Produced by Cultured Cells during Normal Metabolism ». *Nature* 359 (6393): 322-25. <https://doi.org/10.1038/359322a0>.
- Haass, Christian, Cynthia A. Lemere, Anja Capell, Martin Citron, Peter Seubert, Dale Schenk, Lars Lannfelt, et Dennis J. Selkoe. 1995. « The Swedish Mutation Causes Early-Onset Alzheimer's Disease by  $\beta$ -Secretase Cleavage within the Secretory Pathway ». *Nature Medicine* 1 (12): 1291-96. <https://doi.org/10.1038/nm1295-1291>.
- Haass, Christian, et Dennis J. Selkoe. 2007. « Soluble Protein Oligomers in Neurodegeneration: Lessons from the Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 8 (2): 101-12. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>.
- Hall, Jessica E., Wei Fu, et Michael D. Schaller. 2011. « Chapter Five - Focal Adhesion Kinase: Exploring FAK Structure to Gain Insight into Function ». In *International Review of Cell and Molecular Biology*, édité par Kwang W. Jeon, 288:185-225. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386041-5.00005-4>.
- Hamid, Runa, Ellen Kilger, Michael Willem, Neville Vassallo, Markus Kostka, Carsten Bornhövd, Andreas S. Reichert, Hans A. Kretschmar, Christian Haass, et Jochen Herms. 2007. « Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain Modulates Cellular Calcium Homeostasis and ATP

- Content ». *Journal of Neurochemistry* 102 (4): 1264-75. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.04627.x>.
- Hampe, Wolfgang, Meriem Rezgaoui, Irm Hermans-Borgmeyer, et Chica H. Schaller. 2001. « The Genes for the Human VPS10 Domain-Containing Receptors Are Large and Contain Many Small Exons ». *Human Genetics* 108 (6): 529-36. <https://doi.org/10.1007/s004390100504>.
- Hampel, Harald, Simone Lista, et Zaven S. Khachaturian. 2012. « Development of Biomarkers to Chart All Alzheimer's Disease Stages: The Royal Road to Cutting the Therapeutic Gordian Knot ». *Alzheimer's & Dementia: The Journal of the Alzheimer's Association* 8 (4): 312-36. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.05.2116>.
- Hampel, Harald, Robert Vassar, Bart De Strooper, John Hardy, Michael Willem, Neeraj Singh, John Zhou, et al. 2021. « The  $\beta$ -Secretase BACE1 in Alzheimer's Disease ». *Biological Psychiatry* 89 (8): 745-56. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2020.02.001>.
- Han, Kang, Ulrike C. Müller, et Swen Hülsmann. 2017. « Amyloid-precursor Like Proteins APLP1 and APLP2 Are Dispensable for Normal Development of the Neonatal Respiratory Network ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10 (juin): 189. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00189>.
- Han, Seungil, Anil Mistry, Jeanne S. Chang, David Cunningham, Matt Griffor, Peter C. Bonnette, Hong Wang, et al. 2009. « Structural Characterization of Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 (PYK2) Reveals a Unique (DFG-out) Conformation and Enables Inhibitor Design ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (19): 13193-201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M809038200>.
- Haniu, Mitsuru, Paul Denis, Yunjen Young, Elizabeth A. Mendiaz, Janis Fuller, John O. Hui, Brian D. Bennett, et al. 2000. « Characterization of Alzheimer's  $\beta$ -Secretase Protein BACE: A PEPSIN FAMILY MEMBER WITH UNUSUAL PROPERTIES \* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (28): 21099-106. <https://doi.org/10.1074/jbc.M002095200>.
- Hansen, Lawrence A., Eliezer Masliah, Douglas Galasko, et Robert D. Terry. 1993. « Plaque-Only Alzheimer Disease is Usually the Lewy Body Variant, and Vice Versa ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 52 (6): 648-54. <https://doi.org/10.1097/00005072-199311000-00012>.
- Harach, T., N. Marungruang, N. Duthilleul, V. Cheatham, K. D. Mc Coy, G. Frisoni, J. J. Neher, et al. 2017. « Reduction of Abeta amyloid pathology in APPS1 transgenic mice in the absence of gut microbiota ». *Scientific Reports* 7 (février): 41802. <https://doi.org/10.1038/srep41802>.
- Hardy, J. A., et G. A. Higgins. 1992. « Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis ». *Science (New York, N.Y.)* 256 (5054): 184-85. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>.
- Hardy, J., K. Duff, K. G. Hardy, J. Perez-Tur, et M. Hutton. 1998. « Genetic Dissection of Alzheimer's Disease and Related Dementias: Amyloid and Its Relationship to Tau ». *Nature Neuroscience* 1 (5): 355-58. <https://doi.org/10.1038/1565>.
- Hardy, John. 2009. « The Amyloid Hypothesis for Alzheimer's Disease: A Critical Reappraisal: Amyloid Hypothesis for Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 110 (4): 1129-34. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06181.x>.
- Hardy, John, et Dennis J. Selkoe. 2002. « The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics ». *Science (New York, N.Y.)* 297 (5580): 353-56. <https://doi.org/10.1126/science.1072994>.
- Harigaya, Yasuo, Takaomi C. Saido, Christopher B. Eckman, Cristian-Mihail Prada, Mikio Shoji, et Steven G. Younkin. 2000. « Amyloid  $\beta$  Protein Starting Pyroglutamate at Position 3 Is a Major Component of the Amyloid Deposits in the Alzheimer's Disease Brain ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 276 (2): 422-27. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.3490>.
- Harold, Denise, Richard Abraham, Paul Hollingworth, Rebecca Sims, Amy Gerrish, Marian L Hamshere, Jaspreet Singh Pahwa, et al. 2009. « Genome-Wide Association Study Identifies

- Variants at CLU and PICALM Associated with Alzheimer's Disease ». *Nature Genetics* 41 (10): 1088-93. <https://doi.org/10.1038/ng.440>.
- He, Gen, Wenjie Luo, Peng Li, Christine Remmers, William J. Netzer, Joseph Hendrick, Karima Bettayeb, et al. 2010. « Gamma-Secretase Activating Protein Is a Therapeutic Target for Alzheimer's Disease ». *Nature* 467 (7311): 95-98. <https://doi.org/10.1038/nature09325>.
- He, Xiangyuan, Feng Li, Wan-Pin Chang, et Jordan Tang. 2005. « GGA Proteins Mediate the Recycling Pathway of Memapsin 2 (BACE) ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (12): 11696-703. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411296200>.
- Hébert, Sébastien S., Katrien Horr , Laura Nicola , Aikaterini S. Papadopoulou, Wim Mandemakers, Asli N. Silaharoglu, Sakari Kauppinen, André Delacourte, et Bart De Strooper. 2008. « Loss of microRNA Cluster miR-29a/b-1 in Sporadic Alzheimer's Disease Correlates with Increased BACE1/Beta-Secretase Expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (17): 6415-20. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710263105>.
- Hébert, Sébastien S., Lutgarde Serneels, Tim Dejaegere, Katrien Horr , Michal Dabrowski, Veerle Baert, Wim Annaert, Dieter Hartmann, et Bart De Strooper. 2004. « Coordinated and widespread expression of  $\gamma$ -secretase in vivo: evidence for size and molecular heterogeneity ». *Neurobiology of Disease* 17 (2): 260-72. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2004.08.002>.
- Henricson, Anna, Lukas Käll, et Erik L. L. Sonnhammer. 2005. « A Novel Transmembrane Topology of Presenilin Based on Reconciling Experimental and Computational Evidence ». *The FEBS Journal* 272 (11): 2727-33. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04691.x>.
- Hermey, Guido, I.Bj rn Riedel, Wolfgang Hampe, H.Chica Schaller, et Irm Hermans-Borgmeyer. 1999. « Identification and Characterization of SorCS, a Third Member of a Novel Receptor Family ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 266 (2): 347-51. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.1822>.
- Hermey, Guido, Susanne S. Sj gaard, Claus Munck Petersen, Anders Nykjaer, et J rgen Gliemann. 2006. « Tumour Necrosis Factor Alpha-Converting Enzyme Mediates Ectodomain Shedding of Vps10p-Domain Receptor Family Members ». *The Biochemical Journal* 395 (2): 285-93. <https://doi.org/10.1042/BJ20051364>.
- Herms, Jochen, Brigitte Anliker, Sabine Heber, Sabine Ring, Martin Fuhrmann, Hans Kretschmar, Sangram Sisodia, et Ulrike M ller. 2004. « Cortical Dysplasia Resembling Human Type 2 Lissencephaly in Mice Lacking All Three APP Family Members ». *The EMBO Journal* 23 (20): 4106-15. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600390>.
- Herrup, Karl. 2015. « The Case for Rejecting the Amyloid Cascade Hypothesis ». *Nature Neuroscience* 18 (6): 794-99. <https://doi.org/10.1038/nn.4017>.
- Herskowitz, Jeremy H., Katrin Offe, Aniruddha Deshpande, Richard A. Kahn, Allan I. Levey, et James J. Lah. 2012. « GGA1-mediated endocytic traffic of LR11/SorLA alters APP intracellular distribution and amyloid- $\beta$  production ». *Molecular Biology of the Cell* 23 (14): 2645-57. <https://doi.org/10.1091/mbc.E12-01-0014>.
- Herzog, Volker, Gregor Kirfel, Christina Siemes, et Anton Schmitz. 2004. « Biological Roles of APP in the Epidermis ». *European Journal of Cell Biology* 83 (11-12): 613-24. <https://doi.org/10.1078/0171-9335-00401>.
- Higa-Nakamine, Sayomi, Shiho Okitsu-Sakurayama, Shinichiro Kina, et Hideyuki Yamamoto. 2020. « Fyn-mediated Phosphorylation of Pyk2 Promotes Its Activation and Dissociation Downstream of Gonadotropin-releasing Hormone Receptor ». *The FEBS Journal* 287 (16): 3551-64. <https://doi.org/10.1111/febs.15231>.
- Higuchi, Makoto, Nobuhisa Iwata, Yukio Matsuba, Kumi Sato, Kazumi Sasamoto, et Takaomi C. Saido. 2005. « 19F and 1H MRI Detection of Amyloid Beta Plaques in Vivo ». *Nature Neuroscience* 8 (4): 527-33. <https://doi.org/10.1038/nn1422>.

- Hirtz, D, Thurman, D. J., Gwinn-Hardy, K, Mohamed, M, Chaudhuri, A. R., et Zalutsky, R. 2007. « How common are the “common” neurologic disorders? | *Neurology* ». 2007. <https://n.neurology.org/content/68/5/326.long>.
- Hitt, Brian D, Thomas C Jaramillo, Dane M Chetkovich, et Robert Vassar. 2010. « BACE1-/- mice exhibit seizure activity that does not correlate with sodium channel level or axonal localization ». *Molecular Neurodegeneration* 5 (août): 31. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-31>.
- Hoe, H.-S., K. J. Lee, R. S. E. Carney, J. Lee, A. Markova, J.-Y. Lee, B. W. Howell, et al. 2009. « Interaction of Reelin with Amyloid Precursor Protein Promotes Neurite Outgrowth ». *Journal of Neuroscience* 29 (23): 7459-73. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4872-08.2009>.
- Hoffmann, Torsten, Antje Meyer, Ulrich Heiser, Stephan Kurat, Livia Böhme, Martin Kleinschmidt, Karl-Ulrich Bühring, et al. 2017. « Glutaminy Cyclase Inhibitor PQ912 Improves Cognition in Mouse Models of Alzheimer’s Disease—Studies on Relation to Effective Target Occupancy ». *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 362 (1): 119-30. <https://doi.org/10.1124/jpet.117.240614>.
- Holler, Christopher J., Robin L. Webb, Ashley L. Laux, Tina L. Beckett, Dana M. Niedowicz, Rachel R. Ahmed, Yinxing Liu, et al. 2012. « BACE2 Expression Increases in Human Neurodegenerative Disease ». *The American Journal of Pathology* 180 (1): 337-50. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2011.09.034>.
- Holsinger, R. M. Damian, Catriona A. McLean, Konrad Beyreuther, Colin L. Masters, et Geneviève Evin. 2002. « Increased Expression of the Amyloid Precursor B-secretase in Alzheimer’s Disease ». *Annals of Neurology* 51 (6): 783-86. <https://doi.org/10.1002/ana.10208>.
- Holtzman, D. M., J. Herz, et G. Bu. 2012. « Apolipoprotein E and Apolipoprotein E Receptors: Normal Biology and Roles in Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (3): a006312-a006312. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006312>.
- Holtzman, David M. 2001. « Role of apoE/A $\beta$  Interactions in the Pathogenesis of Alzheimer’s Disease and Cerebral Amyloid Angiopathy ». *Journal of Molecular Neuroscience* 17.
- Holtzman, David M., Kelly R. Bales, Tanya Tenkova, Anne M. Fagan, Maia Parsadanian, Leah J. Sartorius, Brian Mackey, et al. 2000. « Apolipoprotein E Isoform-Dependent Amyloid Deposition and Neuritic Degeneration in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97 (6): 2892-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.050004797>.
- Holtzman, David M., Kelly R. Bales, Shan Wu, Priyanka Bhat, Maia Parsadanian, Anne M. Fagan, Louis K. Chang, Yuling Sun, et Steven M. Paul. 1999. « Expression of Human Apolipoprotein E Reduces Amyloid- $\beta$  Deposition in a Mouse Model of Alzheimer’s Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 103 (6): R15-21. <https://doi.org/10.1172/JCI6179>.
- Holtzman, David M., John C. Morris, et Alison M. Goate. 2011. « Alzheimer’s Disease: The Challenge of the Second Century ». *Science Translational Medicine* 3 (77). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3002369>.
- Hook, Vivian, Thomas Toneff, Matthew Bogyo, Doron Greenbaum, Katalin F. Medzihradzsky, John Neveu, William Lane, Gregory Hook, et Terry Reisine. 2005. « Inhibition of Cathepsin B Reduces  $\beta$ -Amyloid Production in Regulated Secretory Vesicles of Neuronal Chromaffin Cells: Evidence for Cathepsin B as a Candidate  $\beta$ -Secretase of Alzheimer’s Disease ». *Biological Chemistry* 386 (9): 931-40. <https://doi.org/10.1515/BC.2005.108>.
- Hook, Vivian Y. H., Mark Kindy, et Gregory Hook. 2008. « Inhibitors of Cathepsin B Improve Memory and Reduce  $\beta$ -Amyloid in Transgenic Alzheimer Disease Mice Expressing the Wild-type, but Not the Swedish Mutant,  $\beta$ -Secretase Site of the Amyloid Precursor Protein\* ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (12): 7745-53. <https://doi.org/10.1074/jbc.M708362200>.

- Hooper, Claudie, Richard Killick, et Simon Lovestone. 2008. « The GSK3 Hypothesis of Alzheimer's Disease: GSK3 and Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 104 (6): 1433-39. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05194.x>.
- Hou, Liming, et Michael G. Zagorski. 2006. « NMR Reveals Anomalous Copper(II) Binding to the Amyloid A $\beta$  Peptide of Alzheimer's Disease ». *Journal of the American Chemical Society* 128 (29): 9260-61. <https://doi.org/10.1021/ja046032u>.
- Howard, Linda, Xiaohong Lu, Sally Mitchell, Susan Griffiths, et Paul Glynn. 1996. « Molecular Cloning of MADM: A Catalytically Active Mammalian Disintegrin-Metalloprotease Expressed in Various Cell Types ». *Biochemical Journal* 317 (1): 45-50. <https://doi.org/10.1042/bj3170045>.
- Hu, Xiangyou, Caitlin W Hicks, Wanxia He, Philip Wong, Wendy B Macklin, Bruce D Trapp, et Riqiang Yan. 2006. « Bace1 Modulates Myelination in the Central and Peripheral Nervous System ». *Nature Neuroscience* 9 (12): 1520-25. <https://doi.org/10.1038/nn1797>.
- Huang, Yadong, et Lennart Mucke. 2012. « Alzheimer Mechanisms and Therapeutic Strategies ». *Cell* 148 (6): 1204-22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.02.040>.
- Huang, Yadong, Karl H. Weisgraber, Lennart Mucke, et Robert W. Mahley. 2004. « Apolipoprotein E ». *Journal of Molecular Neuroscience* 23 (3): 189-204. <https://doi.org/10.1385/JMN:23:3:189>.
- Huang, Yue-Qiao, Wei-Yang Lu, Declan W Ali, Kenneth A Pelkey, Graham M Pitcher, You Ming Lu, Hiroshi Aoto, et al. 2001. « CAK $\beta$ /Pyk2 Kinase Is a Signaling Link for Induction of Long-Term Potentiation in CA1 Hippocampus ».
- Hung, A. Y., C. Haass, R. M. Nitsch, W. Q. Qiu, M. Citron, R. J. Wurtman, J. H. Growdon, et D. J. Selkoe. 1993. « Activation of Protein Kinase C Inhibits Cellular Production of the Amyloid Beta-Protein ». *The Journal of Biological Chemistry* 268 (31): 22959-62.
- Hung, Christy O.Y., et Frederick J. Livesey. 2018. « Altered  $\gamma$ -Secretase Processing of APP Disrupts Lysosome and Autophagosome Function in Monogenic Alzheimer's Disease ». *Cell Reports* 25 (13): 3647-3660.e2. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.11.095>.
- Hunt, Clare E., et Anthony J. Turner. 2009. « Cell Biology, Regulation and Inhibition of  $\beta$ -Secretase (BACE-1) ». *The FEBS Journal* 276 (7): 1845-59. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.06929.x>.
- Hussain, Ishrut, David Powell, David R. Howlett, David G. Tew, Thomas D. Meek, Conrad Chapman, Israel S. Gloger, et al. 1999. « Identification of a Novel Aspartic Protease (Asp 2) as  $\beta$ -Secretase ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 14 (6): 419-27. <https://doi.org/10.1006/mcne.1999.0811>.
- Hutton, M. 1997. « The Presenilins and Alzheimer's Disease ». *Human Molecular Genetics* 6 (10): 1639-46. <https://doi.org/10.1093/hmg/6.10.1639>.
- Hutton, Mike, Frances Busfield, Michelle Wragg, Richard Crook, Jordi Perez-Tur, Robert F. Clark, Guy Prihar, et al. 1996. « Complete Analysis of the Presenilin 1 Gene in Early Onset Alzheimer's Disease ». *NeuroReport* 7 (3): 801.
- Hutton, Mike, Corinne L. Lendon, Patrizia Rizzu, Matt Baker, Susanne Froelich, Henry Houlden, Stuart Pickering-Brown, et al. 1998. « Association of Missense and 5'-Splice-Site Mutations in Tau with the Inherited Dementia FTDP-17 ». *Nature* 393 (6686): 702-5. <https://doi.org/10.1038/31508>.
- Iaccarino, Leonardo, Gautam Tammewar, Nagehan Ayakta, Suzanne L. Baker, Alexandre Bejanin, Adam L. Boxer, Maria Luisa Gorno-Tempini, et al. 2018. « Local and Distant Relationships between Amyloid, Tau and Neurodegeneration in Alzheimer's Disease ». *NeuroImage: Clinical* 17: 452-64. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2017.09.016>.
- Ingelsson, M., H. Fukumoto, K. L. Newell, J. H. Growdon, E. T. Hedley-Whyte, M. P. Frosch, M. S. Albert, B. T. Hyman, et M. C. Irizarry. 2004. « Early Abeta Accumulation and Progressive



- Synaptic Loss, Gliosis, and Tangle Formation in AD Brain ». *Neurology* 62 (6): 925-31.  
<https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000115115.98960.37>.
- Itagaki, S, P McGeer, H Akiyama, S Zhu, et D Selkoe. 1989. « Relationship of Microglia and Astrocytes to Amyloid Deposits of Alzheimer Disease ». *Journal of Neuroimmunology* 24 (3): 173-82.  
[https://doi.org/10.1016/0165-5728\(89\)90115-X](https://doi.org/10.1016/0165-5728(89)90115-X).
- Itoh, T, et P Decamilli. 2006. « BAR, F-BAR (EFC) and ENTH/ANTH Domains in the Regulation of Membrane–Cytosol Interfaces and Membrane Curvature ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* 1761 (8): 897-912.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.06.015>.
- Ittner, Lars M., Yazı D. Ke, Fabien Delerue, Mian Bi, Amadeus Gladbach, Janet Van Eersel, Heidrun Wölfling, et al. 2010. « Dendritic Function of Tau Mediates Amyloid- $\beta$  Toxicity in Alzheimer's Disease Mouse Models ». *Cell* 142 (3): 387-97. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.036>.
- Iwatsubo, Takeshi, David M. A. Mann, Asano Odaka, Nobuhiro Suzuki, et Yasuo Ihara. 1995. « Amyloid  $\beta$  Protein (A $\beta$ ) Deposition: A $\beta$ 42(43) Precedes A $\beta$ 40 in down Syndrome ». *Annals of Neurology* 37 (3): 294-99. <https://doi.org/10.1002/ana.410370305>.
- Iwatsubo, Takeshi, Takaomi C Saido, David M A Mann, et John Q Trojanowski. 1996. « Full-Length Amyloid-F3(1-42(43)) and Amino- Terminally Modified and Truncated Amyloid- (42(43) Deposit in Diffuse Plaques » 149 (6).
- Jack, C. R., R. C. Petersen, Y. Xu, P. C. O'Brien, G. E. Smith, R. J. Ivnik, B. F. Boeve, E. G. Tangalos, et E. Kokmen. 2000. « Rates of Hippocampal Atrophy Correlate with Change in Clinical Status in Aging and AD ». *Neurology* 55 (4): 484-90. <https://doi.org/10.1212/WNL.55.4.484>.
- Jack, Clifford R., et David M. Holtzman. 2013. « Biomarker Modeling of Alzheimer's Disease ». *Neuron* 80 (6): 1347-58. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.12.003>.
- Jacobsen, Linda, Peder Madsen, Christian Jacobsen, Morten S. Nielsen, Jørgen Gliemann, et Claus M. Petersen. 2001. « Activation and Functional Characterization of the Mosaic Receptor SorLA/LR11\* ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (25): 22788-96.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M100857200>.
- Jacobsen, Linda, Peder Madsen, Morten S. Nielsen, Wijnand P.M. Geraerts, Jørgen Gliemann, August B. Smit, et Claus M. Petersen. 2002. « The sorLA Cytoplasmic Domain Interacts with GGA1 and -2 and Defines Minimum Requirements for GGA Binding ». *FEBS Letters* 511 (1-3): 155-58. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03299-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03299-9).
- Jankowsky, Joanna L., Daniel J. Fadale, Jeffrey Anderson, Guilian M. Xu, Victoria Gonzales, Nancy A. Jenkins, Neal G. Copeland, et al. 2004. « Mutant Presenilins Specifically Elevate the Levels of the 42 Residue  $\beta$ -Amyloid Peptide in Vivo: Evidence for Augmentation of a 42-Specific  $\gamma$  Secretase ». *Human Molecular Genetics* 13 (2): 159-70.  
<https://doi.org/10.1093/hmg/ddh019>.
- Jansen, Iris E., Jeanne E. Savage, Kyoko Watanabe, Julien Bryois, Dylan M. Williams, Stacy Steinberg, Julia Sealock, et al. 2019. « Genome-Wide Meta-Analysis Identifies New Loci and Functional Pathways Influencing Alzheimer's Disease Risk ». *Nature Genetics* 51 (3): 404-13.  
<https://doi.org/10.1038/s41588-018-0311-9>.
- Janson, Juliette, Thomas Laedtke, Joseph E. Parisi, Peter O'Brien, Ronald C. Petersen, et Peter C. Butler. 2004. « Increased Risk of Type 2 Diabetes in Alzheimer Disease ». *Diabetes* 53 (2): 474-81. <https://doi.org/10.2337/diabetes.53.2.474>.
- Jarrett, J. T., et P. T. Lansbury. 1993. « Seeding "One-Dimensional Crystallization" of Amyloid: A Pathogenic Mechanism in Alzheimer's Disease and Scrapie? » *Cell* 73 (6): 1055-58.  
[https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90635-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90635-4).
- Jarrett, Joseph T., Elizabeth P. Berger, et Peter T. Lansbury. 1993. « The Carboxy Terminus of the .Beta. Amyloid Protein Is Critical for the Seeding of Amyloid Formation: Implications for the

- Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Biochemistry* 32 (18): 4693-97.  
<https://doi.org/10.1021/bi00069a001>.
- Jawhar, Sadim, Oliver Wirths, et Thomas A. Bayer. 2011. « Pyroglutamate Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ): A Hatchet Man in Alzheimer Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (45): 38825-32.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.R111.288308>.
- Jefferson, Tamara, Mirsada Čaušević, Ulrich auf dem Keller, Oliver Schilling, Simone Isbert, Rebecca Geyer, Wladislaw Maier, et al. 2011. « Metalloprotease Meprin  $\beta$  Generates Nontoxic N-Terminal Amyloid Precursor Protein Fragments in Vivo\* ». *Journal of Biological Chemistry* 286 (31): 27741-50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.252718>.
- Jellinger, Kurt A., et Erich Mitter-Ferstl. 2003. « The Impact of Cerebrovascularlesions in Alzheimer Disease: A Comparative Autopsystudy ». *Journal of Neurology* 250 (9): 1050-55.  
<https://doi.org/10.1007/s00415-003-0142-0>.
- Jensen, Anne Mette G., Yu Kitago, Elnaz Fazeli, Christian B. Vægter, Scott A. Small, Gregory A. Petsko, et Olav M. Andersen. 2023. « Dimerization of the Alzheimer's disease pathogenic receptor SORLA regulates its association with retromer ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120 (4): e2212180120. <https://doi.org/10.1073/pnas.2212180120>.
- Jiang, Qingguang, C.Y. Daniel Lee, Shweta Mandrekar, Brandy Wilkinson, Paige Cramer, Noam Zelcer, Karen Mann, et al. 2008. « ApoE Promotes the Proteolytic Degradation of A $\beta$  ». *Neuron* 58 (5): 681-93. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2008.04.010>.
- Jiao, Bin, Xiaoyan Liu, Lin Zhou, Maggie Haitian Wang, Yafang Zhou, Tingting Xiao, Weiwei Zhang, et al. 2015. « Polygenic Analysis of Late-Onset Alzheimer's Disease from Mainland China ». Édité par Riqiang Yan. *PLOS ONE* 10 (12): e0144898.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144898>.
- Johnson, G. V., et J. A. Hartigan. 1999. « Tau Protein in Normal and Alzheimer's Disease Brain: An Update ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 1 (4-5): 329-51. <https://doi.org/10.3233/jad-1999-14-512>.
- Jonsson, Thorlakur, Jasvinder K. Atwal, Stacy Steinberg, Jon Snaedal, Palmi V. Jonsson, Sigurbjorn Bjornsson, Hreinn Stefansson, et al. 2012. « A Mutation in APP Protects against Alzheimer's Disease and Age-Related Cognitive Decline ». *Nature* 488 (7409): 96-99.  
<https://doi.org/10.1038/nature11283>.
- Jonsson, Thorlakur, Hreinn Stefansson, Stacy Steinberg, Ingileif Jonsdottir, Palmi V. Jonsson, Jon Snaedal, Sigurbjorn Bjornsson, et al. 2013. « Variant of *TREM2* Associated with the Risk of Alzheimer's Disease ». *New England Journal of Medicine* 368 (2): 107-16.  
<https://doi.org/10.1056/NEJMoa1211103>.
- Jorissen, Ellen, Johannes Prox, Christian Bernreuther, Silvio Weber, Ralf Schwanbeck, Lutgarde Serneels, An Snellinx, et al. 2010. « The Disintegrin/Metalloproteinase ADAM10 Is Essential for the Establishment of the Brain Cortex ». *The Journal of Neuroscience* 30 (14): 4833-44.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5221-09.2010>.
- Joseph, James, Greg Cole, Elizabeth Head, et Donald Ingram. 2009. « Nutrition, Brain Aging, and Neurodegeneration: Table 1. ». *The Journal of Neuroscience* 29 (41): 12795-801.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3520-09.2009>.
- Joshi, Pownima, Jennifer O. Liang, Kristine DiMonte, John Sullivan, et Sanjay W. Pimplikar. 2009. « Amyloid precursor protein is required for convergent-extension movements during Zebrafish development ». *Developmental Biology* 335 (1): 1-11.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.041>.
- Jun, G, C A Ibrahim-Verbaas, M Vronskaya, J-C Lambert, J Chung, A C Naj, B W Kunkle, et al. 2016. « A Novel Alzheimer Disease Locus Located near the Gene Encoding Tau Protein ». *Molecular Psychiatry* 21 (1): 108-17. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.23>.

- Kaether, Christoph, Anja Capell, Dieter Edbauer, Edith Winkler, Bozidar Novak, Harald Steiner, et Christian Haass. 2004. « The presenilin C-terminus is required for ER-retention, nicastrin-binding and  $\gamma$ -secretase activity ». *The EMBO Journal* 23 (24): 4738-48. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600478>.
- Kakuda, Nobuto, Satoru Funamoto, Sousuke Yagishita, Mako Takami, Satoko Osawa, Naoshi Dohmae, et Yasuo Ihara. 2006. « Equimolar Production of Amyloid  $\beta$ -Protein and Amyloid Precursor Protein Intracellular Domain from  $\beta$ -Carboxyl-Terminal Fragment by  $\gamma$ -Secretase \* ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (21): 14776-86. <https://doi.org/10.1074/jbc.M513453200>.
- Kamboh, M I, F Y Demirci, X Wang, R L Minster, M M Carrasquillo, V S Pankratz, S G Younkin, et al. 2012. « Genome-Wide Association Study of Alzheimer's Disease ». *Translational Psychiatry* 2 (5): e117-e117. <https://doi.org/10.1038/tp.2012.45>.
- Kamenetz, Flavio, Taisuke Tomita, Helen Hsieh, Guy Seabrook, David Borchelt, Takeshi Iwatsubo, Sangram Sisodia, et Roberto Malinow. 2003. « APP Processing and Synaptic Function ». *Neuron* 37 (6): 925-37. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00124-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00124-7).
- Kamer, Angela R., Ronald G. Craig, Richard Niederman, Juan Fortea, et Mony J. de Leon. 2020. « Periodontal Disease as a Possible Cause for Alzheimer's Disease ». *Periodontology 2000* 83 (1): 242-71. <https://doi.org/10.1111/prd.12327>.
- Kametani, Fuyuki, et Masato Hasegawa. 2018. « Reconsideration of Amyloid Hypothesis and Tau Hypothesis in Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Neuroscience* 12: 25. <https://doi.org/10.3389/fnins.2018.00025>.
- Kamijo, Takehiko, Frederique Zindy, Martine F Roussel, Dawn E Quelle, James R Downing, Richard A Ashmun, Gerard Grosveld, et Charles J Sherr. 1997. « Tumor Suppression at the Mouse INK4a Locus Mediated by the Alternative Reading Frame Product p19ARF ».
- Kaminska, Paulina, Ovesen, Peter L., Jakiel, Mateusz, Obrebski, Tomasz, et Malik, Anna R. 2023. « SorLA restricts TNF $\alpha$  release from microglia to shape glioma-supportive brain microenvironment », 12 avril 2023.
- Kaneko, Masayuki, Hiroshi Koike, Ryo Saito, Yoshihisa Kitamura, Yasunobu Okuma, et Yasuyuki Nomura. 2010. « Loss of HRD1-Mediated Protein Degradation Causes Amyloid Precursor Protein Accumulation and Amyloid- $\beta$  Generation ». *The Journal of Neuroscience* 30 (11): 3924-32. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2422-09.2010>.
- Kang, J., H. G. Lemaire, A. Unterbeck, J. M. Salbaum, C. L. Masters, K. H. Grzeschik, G. Multhaup, K. Beyreuther, et B. Müller-Hill. 1987. « The Precursor of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Protein Resembles a Cell-Surface Receptor ». *Nature* 325 (6106): 733-36. <https://doi.org/10.1038/325733a0>.
- Kang, J., et B. Müller-Hill. 1990. « Differential Splicing of Alzheimer's Disease Amyloid A4 Precursor RNA in Rat Tissues: PreA4(695) mRNA Is Predominantly Produced in Rat and Human Brain ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 166 (3): 1192-1200. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(90\)90992-v](https://doi.org/10.1016/0006-291x(90)90992-v).
- Karkisaval, Abhijith G, Agueda Rostagno, Rustam Azimov, Deependra K Ban, Jorge Ghiso, Bruce L. Kagan, et Ratnesh Lal. 2020. « Ion Channel Formation by N-Terminally Truncated A $\beta$  (4-42): Relevance for the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine* 29 (octobre): 102235. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2020.102235>.
- Karran, Eric, Marc Mercken, et Bart De Strooper. 2011. « The Amyloid Cascade Hypothesis for Alzheimer's Disease: An Appraisal for the Development of Therapeutics ». *Nature Reviews Drug Discovery* 10 (9): 698-712. <https://doi.org/10.1038/nrd3505>.
- Kasa, Peter, et Zoltan Rakonczay. 1997. « THE CHOLINERGIC SYSTEM IN ALZHEIMER'S DISEASE ».
- Kaufman, Adam C., Santiago V. Salazar, Laura T. Haas, Jinhee Yang, Mikhail A. Kostylev, Amanda T. Jeng, Sophie A. Robinson, et al. 2015. « Fyn Inhibition Rescues Established Memory and

- Synapse Loss in Alzheimer Mice ». *Annals of Neurology* 77 (6): 953-71.  
<https://doi.org/10.1002/ana.24394>.
- Kauwe, J.S.K., S. Bertelsen, K. Mayo, C. Cruchaga, R. Abraham, P. Hollingworth, D. Harold, et al. 2009. « Suggestive Synergy between Genetic Variants in TF and HFE as Risk Factors for Alzheimer's Disease ». *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics* 153B (4): 955-59. <https://doi.org/10.1002/ajmg.b.31053>.
- Kawai, M., P. Cras, et G. Perry. 1992. « Serial Reconstruction of Beta-Protein Amyloid Plaques: Relationship to Microvessels and Size Distribution ». *Brain Research* 592 (1-2): 278-82.  
[https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)91686-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)91686-9).
- Kennedy, Mary B. 2016. « Synaptic Signaling in Learning and Memory ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 8 (2): a016824. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a016824>.
- Kessels, Helmut W., Louis N. Nguyen, Sadegh Nabavi, et Roberto Malinow. 2010. « The Prion Protein as a Receptor for Amyloid- $\beta$  ». *Nature* 466 (7308): E3-4.  
<https://doi.org/10.1038/nature09217>.
- Khaled, Mohammed, Isabel Rönnbäck, Leopold L. Ilag, Astrid Gräslund, Birgit Strodel, et Nicklas Österlund. 2023. « A Hairpin Motif in the Amyloid- $\beta$  Peptide Is Important for Formation of Disease-Related Oligomers ». *Journal of the American Chemical Society* 145 (33): 18340-54.  
<https://doi.org/10.1021/jacs.3c03980>.
- Kidd, M. 1963. « Paired Helical Filaments in Electron Microscopy of Alzheimer's Disease ». *Nature* 197 (janvier): 192-93. <https://doi.org/10.1038/197192b0>.
- Kienlen-Campard, Pascal, Sarah Miolet, Bernadette Tasiaux, et Jean-Noël Octave. 2002. « Intracellular Amyloid- $\beta$ 1-42, but Not Extracellular Soluble Amyloid- $\beta$  Peptides, Induces Neuronal Apoptosis\* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (18): 15666-70.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M200887200>.
- Kilinc, Devrim, Anaïs-Camille Vreulx, Tiago Mendes, Amandine Flaig, Diego Marques-Coelho, Maxime Verschoore, Florie Demiautte, et al. 2020. « Pyk2 Overexpression in Postsynaptic Neurons Blocks Amyloid B1-42-Induced Synaptotoxicity in Microfluidic Co-Cultures ». *Brain Communications* 2 (2): fcaa139. <https://doi.org/10.1093/braincomms/fcaa139>.
- Kim, Hye-Sun, Eun-Mee Kim, Jean-Pyo Lee, Cheol Hyoung Park, Seonghan Kim, Ji-Heui Seo, Keun-A Chang, et al. 2003. « C-Terminal Fragments of Amyloid Precursor Protein Exert Neurotoxicity by Inducing Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Expression ». *The FASEB Journal* 17 (13): 1-28.  
<https://doi.org/10.1096/fj.03-0106fje>.
- Kim, Jungsu, Jacob M. Basak, et David M. Holtzman. 2009. « The Role of Apolipoprotein E in Alzheimer's Disease ». *Neuron* 63 (3): 287-303.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2009.06.026>.
- Kim, Seong-Hun, Ye Ingrid Yin, Yue-Ming Li, et Sangram S. Sisodia. 2004. « Evidence That Assembly of an Active  $\gamma$ -Secretase Complex Occurs in the Early Compartments of the Secretory Pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (47): 48615-19.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.C400396200>.
- Kimberly, W. Taylor, Matthew J. LaVoie, Beth L. Ostaszewski, Wenjuan Ye, Michael S. Wolfe, et Dennis J. Selkoe. 2003. «  $\gamma$ -Secretase Is a Membrane Protein Complex Comprised of Presenilin, Nicastrin, Aph-1, and Pen-2 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (11): 6382-87. <https://doi.org/10.1073/pnas.1037392100>.
- King-Robson, Josh, Heather Wilson, Marios Politis, et for the Alzheimer's Disease Neuroimaging Initiative. 2021. « Associations Between Amyloid and Tau Pathology, and Connectome Alterations, in Alzheimer's Disease and Mild Cognitive Impairment ». *Journal of Alzheimer's Disease* 82 (2): 541-60. <https://doi.org/10.3233/JAD-201457>.

- Kitaguchi, N., Y. Takahashi, Y. Tokushima, S. Shiojiri, et H. Ito. 1988. « Novel Precursor of Alzheimer's Disease Amyloid Protein Shows Protease Inhibitory Activity ». *Nature* 331 (6156): 530-32. <https://doi.org/10.1038/331530a0>.
- Kitazume, Shinobu, Yuriko Tachida, Ritsuko Oka, Keiro Shirovani, Takaomi C. Saido, et Yasuhiro Hashimoto. 2001. « Alzheimer's  $\beta$ -secretase,  $\beta$ -site amyloid precursor protein-cleaving enzyme, is responsible for cleavage secretion of a Golgi-resident sialyltransferase ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 98 (24): 13554-59. <https://doi.org/10.1073/pnas.241509198>.
- Kivipelto, M., E. L. Helkala, T. Hänninen, M. P. Laakso, M. Hallikainen, K. Alhainen, H. Soininen, J. Tuomilehto, et A. Nissinen. 2001. « Midlife Vascular Risk Factors and Late-Life Mild Cognitive Impairment: A Population-Based Study ». *Neurology* 56 (12): 1683-89. <https://doi.org/10.1212/wnl.56.12.1683>.
- Klevanski, Maja, Ulrike Herrmann, Sascha W. Weyer, Romain Fol, Nathalie Cartier, David P. Wolfer, John H. Caldwell, Martin Korte, et Ulrike C. Müller. 2015. « The APP Intracellular Domain Is Required for Normal Synaptic Morphology, Synaptic Plasticity, and Hippocampus-Dependent Behavior ». *The Journal of Neuroscience* 35 (49): 16018-33. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2009-15.2015>.
- Kling, Mitchel A., John Q. Trojanowski, David A. Wolk, Virginia M.Y. Lee, et Steven E. Arnold. 2013. « Vascular Disease and Dementias: Paradigm Shifts to Drive Research in New Directions ». *Alzheimer's & Dementia* 9 (1): 76-92. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2012.02.007>.
- Klionsky, Daniel J, Eric H Baehrecke, John H Brumell, Charleen T Chu, Patrice Codogno, Ana Maria Cuervo, Jayanta Debnath, et al. 2011. « A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition) ». *Autophagy* 7 (11): 1273-94. <https://doi.org/10.4161/auto.7.11.17661>.
- Klunk, William E., Henry Engler, Agneta Nordberg, Yanming Wang, Gunnar Blomqvist, Daniel P. Holt, Mats Bergström, et al. 2004. « Imaging Brain Amyloid in Alzheimer's Disease with Pittsburgh Compound-B ». *Annals of Neurology* 55 (3): 306-19. <https://doi.org/10.1002/ana.20009>.
- Köhler, Christoph, Maja Dinekov, et Jürgen Götz. 2013. « Active Glycogen Synthase Kinase-3 and Tau Pathology-Related Tyrosine Phosphorylation in pR5 Human Tau Transgenic Mice ». *Neurobiology of Aging* 34 (5): 1369-79. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.11.010>.
- Kohutek, Zachary A., Charles G. diPierro, Gerard T. Redpath, et Isa M. Hussaini. 2009. « ADAM-10-Mediated N-Cadherin Cleavage Is Protein Kinase C- $\alpha$  Dependent and Promotes Glioblastoma Cell Migration ». *The Journal of Neuroscience* 29 (14): 4605-15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5126-08.2009>.
- Koike, Hisashi, Shigeo Tomioka, Hiroyuki Sorimachi, Takaomi C Saido, Kei Maruyama, Akira Okuyama, Atsuko Fujisawa-Sehara, Shigeo Ohno, Koichi Suzuki, et Shoichi Ishiura. 1999. « Membrane-Anchored Metalloprotease MDC9 Has an  $\alpha$ -Secretase Activity Responsible for Processing the Amyloid Precursor Protein ».
- Koistinaho, Milla, Suizhen Lin, Xin Wu, Michail Esterman, Deanna Koger, Jeffrey Hanson, Richard Higgs, et al. 2004. « Apolipoprotein E Promotes Astrocyte Colocalization and Degradation of Deposited Amyloid-Beta Peptides ». *Nature Medicine* 10 (7): 719-26. <https://doi.org/10.1038/nm1058>.
- Kojro, Elzbieta, Gerald Gimpl, et Sven Lammich. 2001. « Low Cholesterol Stimulates the Nonamyloidogenic Pathway by Its Effect on the  $\beta$ -Secretase ». *MEDICAL SCIENCES*.
- Kojro, Elzbieta, Rolf Postina, Corinna Buro, Christoph Meiringer, Katja Gehrig-Burger, et Falk Fahrenholz. 2006. « The Neuropeptide PACAP Promotes  $\beta$ -Secretase Pathway for Processing Alzheimer Amyloid Precursor Protein ». *The FASEB Journal* 20 (3): 512-14. <https://doi.org/10.1096/fj.05-4812fje>.

- Kontush, Anatol. 2001. « AMYLOID- $\beta$ : AN ANTIOXIDANT THAT BECOMES A PRO-OXIDANT AND CRITICALLY CONTRIBUTES TO ALZHEIMER'S DISEASE ».
- Koo, E. H., et S. L. Squazzo. 1994. « Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway ». *Journal of Biological Chemistry* 269 (26): 17386-89. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)32449-3](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)32449-3).
- Korade, Zeljka, et Anne K. Kenworthy. 2008. « Lipid Rafts, Cholesterol, and the Brain ». *Neuropharmacology* 55 (8): 1265-73. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.02.019>.
- Korf, Esther S.C., Lon R. White, Philip Scheltens, et Lenore J. Launer. 2004. « Midlife Blood Pressure and the Risk of Hippocampal Atrophy: The Honolulu Asia Aging Study ». *Hypertension* 44 (1): 29-34. <https://doi.org/10.1161/01.HYP.0000132475.32317.bb>.
- Kouchi, Zen, Tadatoshi Kinouchi, Hiroyuki Sorimachi, Shoichi Ishiura, et Koichi Suzuki. 1998. « The Deletion of the C-Terminal Tail and Addition of an Endoplasmic Reticulum Targeting Signal to Alzheimer's Amyloid Precursor Protein Change Its Localization, Secretion, and Intracellular Proteolysis ». *European Journal of Biochemistry* 258 (2): 291-300. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.1998.2580291.x>.
- Kouchi, Zen, Hiroyuki Sorimachi, Koichi Suzuki, et Shoichi Ishiura. 1999. « Proteasome Inhibitors Induce the Association of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein with Hsc73 ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 254 (3): 804-10. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1998.9977>.
- Koudinov, Alexei R, Temirbolat T Berezov, Asok Kumar, et Natalia V Koudinova. 1998. « Alzheimer's Amyloid b Interaction with Normal Human Plasma High Density Lipoprotein: Association with Apolipoprotein and Lipids ». *Clinica Chimica Acta*.
- Krstic, Dimitrije, Amrita Madhusudan, Jana Doehner, Prisca Vogel, Tina Notter, Claudine Imhof, Abigail Manalastas, et al. 2012. « Systemic Immune Challenges Trigger and Drive Alzheimer-like Neuropathology in Mice ». *Journal of Neuroinflammation* 9 (1): 151. <https://doi.org/10.1186/1742-2094-9-151>.
- Kuhn, Peer-Hendrik, Huanhuan Wang, Bastian Dislich, Alessio Colombo, Ulrike Zeitschel, Joachim W Ellwart, Elisabeth Kremmer, Steffen Roßner, et Stefan F Lichtenthaler. 2010. « ADAM10 Is the Physiologically Relevant, Constitutive  $\alpha$ -Secretase of the Amyloid Precursor Protein in Primary Neurons ». *The EMBO Journal* 29 (17): 3020-32. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.167>.
- Kunkle, Brian W., Benjamin Grenier-Boley, Rebecca Sims, Joshua C. Bis, Vincent Damotte, Adam C. Naj, Anne Boland, et al. 2019. « Genetic Meta-Analysis of Diagnosed Alzheimer's Disease Identifies New Risk Loci and Implicates A $\beta$ , Tau, Immunity and Lipid Processing ». *Nature Genetics* 51 (3): 414-30. <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0358-2>.
- Kunz, Joachim B., Heinz Schwarz, et Andreas Mayer. 2004. « Determination of Four Sequential Stages during Microautophagy in Vitro\* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 9987-96. <https://doi.org/10.1074/jbc.M307905200>.
- Kuperstein, Inna, Kerensa Broersen, Iryna Benilova, Jef Rozenski, Wim Jonckheere, Maja Debulpaep, Annelies Vandersteen, et al. 2010. « Neurotoxicity of Alzheimer's Disease A $\beta$  Peptides Is Induced by Small Changes in the A $\beta$ 42 to A $\beta$ 40 Ratio ». *The EMBO Journal* 29 (19): 3408-20. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.211>.
- Kurup, Pradeep, Yongfang Zhang, Deepa V. Venkitaramani, Jian Xu, et Paul J. Lombroso. 2010. « The Role of STEP in Alzheimer's Disease ». *Channels* 4 (5): 347-50. <https://doi.org/10.4161/chan.4.5.12910>.
- Kurup, Pradeep, Yongfang Zhang, Jian Xu, Deepa V. Venkitaramani, Vahram Haroutunian, Paul Greengard, Angus C. Nairn, et Paul J. Lombroso. 2010. « A $\beta$ -Mediated NMDA Receptor Endocytosis in Alzheimer's Disease Involves Ubiquitination of the Tyrosine Phosphatase STEP



- 61 ». *The Journal of Neuroscience* 30 (17): 5948-57.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0157-10.2010>.
- Kurz, A., R. Egensperger, M. Haupt, N. Lautenschlager, B. Romero, M. B. Graeber, et U. Müller. 1996. « Apolipoprotein E Epsilon 4 Allele, Cognitive Decline, and Deterioration of Everyday Performance in Alzheimer's Disease ». *Neurology* 47 (2): 440-43.  
<https://doi.org/10.1212/wnl.47.2.440>.
- Kuusisto, J, K Koivisto, K Kervinen, L Mykkanen, E-L Helkala, M Vanhanen, T Hanninen, et al. 1994. « Association of Apolipoprotein E Phenotypes with Late Onset Alzheimer's Disease: Population Based Study ». *BMJ* 309 (6955): 636-38.  
<https://doi.org/10.1136/bmj.309.6955.636>.
- Kwart, Dylan, Andrew Gregg, Claudia Scheckel, Elisabeth A. Murphy, Dominik Paquet, Michael Duffield, John Fak, Olav Olsen, Robert B. Darnell, et Marc Tessier-Lavigne. 2019. « A Large Panel of Isogenic APP and PSEN1 Mutant Human iPSC Neurons Reveals Shared Endosomal Abnormalities Mediated by APP  $\beta$ -CTFs, Not A $\beta$  ». *Neuron* 104 (2): 256-270.e5.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuron.2019.07.010>.
- Kyratzi, Elli, et Spiros Efthimiopoulos. 2014. « Calcium Regulates the Interaction of Amyloid Precursor Protein with Homer3 Protein ». *Neurobiology of Aging* 35 (9): 2053-63.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.03.019>.
- LaDu, M. J., M. T. Falduto, A. M. Manelli, C. A. Reardon, G. S. Getz, et D. E. Frail. 1994. « Isoform-specific binding of apolipoprotein E to beta-amyloid. » *Journal of Biological Chemistry* 269 (38): 23403-6. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)31529-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)31529-6).
- Lai, Albert, Sangram S. Sisodia, et Ian S. Trowbridge. 1995. « Characterization of Sorting Signals in the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Cytoplasmic Domain (\*) ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (8): 3565-73. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.8.3565>.
- Laird, Fiona M., Huaibin Cai, Alena V. Savonenko, Mohamed H. Farah, Kaiwen He, Tatyana Melnikova, Hongjin Wen, et al. 2005. « BACE1, a Major Determinant of Selective Vulnerability of the Brain to Amyloid- $\beta$  Amyloidogenesis, Is Essential for Cognitive, Emotional, and Synaptic Functions ». *The Journal of Neuroscience* 25 (50): 11693-709.  
<https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2766-05.2005>.
- Lakkakorpi, Päivi T., Andrew J. Bett, Lorraine Lipfert, Gideon A. Rodan, et Le T. Duong. 2003. « PYK2 Autophosphorylation, but Not Kinase Activity, Is Necessary for Adhesion-induced Association with c-Src, Osteoclast Spreading, and Bone Resorption\* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (13): 11502-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M206579200>.
- Lambert, J-C. 2005. « Is There a Relation between APOE Expression and Brain Amyloid Load in Alzheimer's Disease? » *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 76 (7): 928-33.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp.2004.048983>.
- Lambert, J-C, D Mann, L Goumidi, J Harris, P Amouyel, T Iwatsubo, C Lendon, et M-C Chartier-Harlin. 2001. « Effect of the APOE Promoter Polymorphisms on Cerebral Amyloid Peptide Deposition in Alzheimer's Disease ». *The Lancet* 357 (9256): 608-9. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)04063-0](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)04063-0).
- Lambert, Jean-Charles. 2002. « Contribution of APOE promoter polymorphisms to Alzheimer's disease risk | Neurology ». 2002. <https://n.neurology.org/content/59/1/59.short>.
- Lambert, Jean-Charles, et Philippe Amouyel. 2011. « Genetics of Alzheimer's Disease: New Evidences for an Old Hypothesis? » *Current Opinion in Genetics & Development* 21 (3): 295-301.  
<https://doi.org/10.1016/j.gde.2011.02.002>.
- Lambert, Jean-Charles, Benjamin Grenier-Boley, Vincent Chouraki, Simon Heath, Diana Zelenika, Nathalie Fievet, Didier Hannequin, et al. 2010. « Implication of the Immune System in Alzheimer's Disease: Evidence from Genome-Wide Pathway Analysis ». *Journal of Alzheimer's Disease* 20 (4): 1107-18. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100018>.

- Lambert, Jean-Charles, Carla A Ibrahim-Verbaas, Denise Harold, Adam C Naj, Rebecca Sims, Céline Bellenguez, Gyungah Jun, et al. 2013. « Meta-analysis of 74,046 individuals identifies 11 new susceptibility loci for Alzheimer's disease ». *Nature genetics* 45 (12): 1452-58. <https://doi.org/10.1038/ng.2802>.
- Lambert, Jean-Charles, David M. A. Mann, Judith M. Harris, Marie-Christine Chartier-Harlin, Alistair Cumming, John Coates, Helen Lemmon, David StClair, Takeshi Iwatsubo, et Corinne Lendon. 2001. « The -48 C/T Polymorphism in the Presenilin 1 Promoter Is Associated with an Increased Risk of Developing Alzheimer's Disease and an Increased A $\beta$  Load in Brain ». *Journal of Medical Genetics* 38 (6): 353-55. <https://doi.org/10.1136/jmg.38.6.353>.
- Lammich, Sven, Elzbieta Kojro, Rolf Postina, Sandra Gilbert, Roland Pfeiffer, Marek Jasionowski, Christian Haass, et Falk Fahrenholz. 1999. « Constitutive and Regulated  $\gamma$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by a Disintegrin Metalloprotease ». *Medical Sciences*.
- Lane, Rachel F., Summer M. Raines, John W. Steele, Michelle E. Ehrlich, James A. Lah, Scott A. Small, Rudolph E. Tanzi, Alan D. Attie, et Sam Gandy. 2010. « Diabetes-Associated SorCS1 Regulates Alzheimer's Amyloid- $\beta$  Metabolism: Evidence for Involvement of SorL1 and the Retromer Complex ». *The Journal of Neuroscience* 30 (39): 13110-15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3872-10.2010>.
- Laudon, Hanna, Emil M. Hansson, Karin Melén, Anna Bergman, Mark R. Farmery, Bengt Winblad, Urban Lendahl, Gunnar Von Heijne, et Jan Näslund. 2005. « A Nine-Transmembrane Domain Topology for Presenilin 1 ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (42): 35352-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M507217200>.
- Laurén, Juha, David A. Gimbel, Haakon B. Nygaard, John W. Gilbert, et Stephen M. Strittmatter. 2009. « Cellular Prion Protein Mediates Impairment of Synaptic Plasticity by Amyloid- $\beta$  Oligomers ». *Nature* 457 (7233): 1128-32. <https://doi.org/10.1038/nature07761>.
- Lauritzen, Inger, Anaïs Bécot, Alexandre Bourgeois, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Maria-Grazia Biferi, Martine Barkats, et Frédéric Checler. 2019. « Targeting  $\gamma$ -Secretase Triggers the Selective Enrichment of Oligomeric APP-CTFs in Brain Extracellular Vesicles from Alzheimer Cell and Mouse Models ». *Translational Neurodegeneration* 8 (1): 35. <https://doi.org/10.1186/s40035-019-0176-6>.
- Lauritzen, Inger, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Charlotte Bauer, Elizabeth Brigham, Jean-Daniel Abraham, Sébastien Ranaldi, Paul Fraser, et al. 2012. « The  $\beta$ -Secretase-Derived C-Terminal Fragment of  $\beta$ APP, C99, But Not A $\beta$ , Is a Key Contributor to Early Intraneuronal Lesions in Triple-Transgenic Mouse Hippocampus ». *The Journal of Neuroscience* 32 (46): 16243-55. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2775-12.2012>.
- Lauritzen, Inger, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Alexandre Bourgeois, Sophie Pagnotta, Maria-Grazia Biferi, Martine Barkats, Pascale Lacor, William Klein, Charlotte Bauer, et Frederic Checler. 2016. « Intraneuronal Aggregation of the  $\beta$ -CTF Fragment of APP (C99) Induces A $\beta$ -Independent Lysosomal-Autophagic Pathology ». *Acta Neuropathologica* 132 (2): 257-76. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1577-6>.
- Lautenschlager, N. T., L. A. Cupples, V. S. Rao, S. A. Auerbach, R. Becker, J. Burke, H. Chui, et al. 1996. « Risk of Dementia among Relatives of Alzheimer's Disease Patients in the MIRAGE Study: What Is in Store for the Oldest Old? » *Neurology* 46 (3): 641-50. <https://doi.org/10.1212/wnl.46.3.641>.
- LaVoie, Matthew J., Patrick C. Fraering, Beth L. Ostaszewski, Wenjuan Ye, W. Taylor Kimberly, Michael S. Wolfe, et Dennis J. Selkoe. 2003. « Assembly of the  $\gamma$ -Secretase Complex Involves Early Formation of an Intermediate Subcomplex of Aph-1 and Nicastrin \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (39): 37213-22. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303941200>.

- Lazarov, Orly, et Michael P. Demars. 2012. « All in the Family: How the APPs Regulate Neurogenesis ». *Frontiers in Neuroscience* 6: 81. <https://doi.org/10.3389/fnins.2012.00081>.
- Le Gall, Sylvain M., Pierre Bobé, Karina Reiss, Keisuke Horiuchi, Xiao-Da Niu, Daniel Lundell, David R. Gibb, Daniel Conrad, Paul Saftig, et Carl P. Blobel. 2009. « ADAMs 10 and 17 Represent Differentially Regulated Components of a General Shedding Machinery for Membrane Proteins Such as Transforming Growth Factor  $\alpha$ , L-Selectin, and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  ». *Molecular Biology of the Cell* 20 (6): 1785-94. <https://doi.org/10.1091/mbc.e08-11-1135>.
- Lee, Edward B., Daniel M. Skovronsky, Farhad Abtahian, Robert W. Doms, et Virginia M. -Y. Lee. 2003. « Secretion and Intracellular Generation of Truncated A $\beta$  in  $\beta$ -Site Amyloid- $\beta$  Precursor Protein-cleaving Enzyme Expressing Human Neurons\* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (7): 4458-66. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210105200>.
- Lee, G., S.T. Newman, D.L. Gard, H. Band, et G. Panchamoorthy. 1998. « Tau interacts with src-family non-receptor tyrosine kinases ». *Journal of Cell Science* 111 (21): 3167-77. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.21.3167>.
- Lee, Gloria, Ramasamy Thangavel, Vandana M. Sharma, Joel M. Litersky, Kiran Bhaskar, Sandy M. Fang, Lana H. Do, Athena Andreadis, Gary Van Hoesen, et Hanna Ksiezak-Reding. 2004. « Phosphorylation of Tau by Fyn: Implications for Alzheimer's Disease ». *The Journal of Neuroscience* 24 (9): 2304-12. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4162-03.2004>.
- Lee, Jiyeon, Claudio Retamal, Loreto Cuitiño, Amy Caruano-Yzermans, Jung-Eun Shin, Peter Van Kerkhof, Maria-Paz Marzolo, et Guojun Bu. 2008. « Adaptor Protein Sorting Nexin 17 Regulates Amyloid Precursor Protein Trafficking and Processing in the Early Endosomes ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (17): 11501-8. <https://doi.org/10.1074/jbc.M800642200>.
- Lee, Joon, Alan L. Gillman, Hyunbum Jang, Srinivasan Ramachandran, Bruce L. Kagan, Ruth Nussinov, et Fernando Teran Arce. 2014. « Role of the Fast Kinetics of Pyroglutamate-Modified Amyloid- $\beta$  Oligomers in Membrane Binding and Membrane Permeability ». *Biochemistry* 53 (28): 4704-14. <https://doi.org/10.1021/bi500587p>.
- Lee, Michael K., Hilda H. Slunt, Lee J. Martin, Gopal Thinakaran, Grace Kim, Samuel E. Gandy, Mary Seeger, Edward Koo, Donald L. Price, et Sangram S. Sisodia. 1996. « Expression of Presenilin 1 and 2 (PS1 and PS2) in Human and Murine Tissues ». *The Journal of Neuroscience* 16 (23): 7513-25. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.16-23-07513.1996>.
- Lee, Sheu-Fen, Sanjiv Shah, Cong Yu, W. Christian Wigley, Harry Li, Myungsil Lim, Kia Pedersen, et al. 2004. « A Conserved GXXXG Motif in APH-1 Is Critical for Assembly and Activity of the  $\gamma$ -Secretase Complex ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (6): 4144-52. <https://doi.org/10.1074/jbc.M309745200>.
- Lee, Suho, Santiago V. Salazar, Timothy O. Cox, et Stephen M. Strittmatter. 2019. « Pyk2 Signaling through Graf1 and RhoA GTPase Is Required for Amyloid- $\beta$  Oligomer-Triggered Synapse Loss ». *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience* 39 (10): 1910-29. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2983-18.2018>.
- Lehman, Norman L. 2009. « The ubiquitin proteasome system in neuropathology ». *Acta Neuropathologica* 118 (3): 329-47. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0560-x>.
- Letenneur, L., V. Gilleron, D. Commenges, C. Helmer, J. M. Orgogozo, et J. F. Dartigues. 1999. « Are Sex and Educational Level Independent Predictors of Dementia and Alzheimer's Disease? Incidence Data from the PAQUID Project ». *Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry* 66 (2): 177-83. <https://doi.org/10.1136/jnnp.66.2.177>.
- Letronne, Florent, Geoffroy Laumet, Anne-Marie Ayrat, Julien Chapuis, Florie Demiautte, Mathias Laga, Michel E. Vandenberghe, et al. 2016. « ADAM30 Downregulates APP-Linked Defects Through Cathepsin D Activation in Alzheimer's Disease ». *EBioMedicine* 9 (juillet): 278-92. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2016.06.002>.

- Levy, Efrat, Mark D. Carman, Ivan J. Fernandez-Madrid, Michael D. Power, Ivan Lieberburg, Sjoerd G. van Duinen, Gerard Th. A. M. Bots, Willem Luyendijk, et Blas Frangione. 1990. « Mutation of the Alzheimer's Disease Amyloid Gene in Hereditary Cerebral Hemorrhage, Dutch Type ». *Science* 248 (4959): 1124-26. <https://doi.org/10.1126/science.2111584>.
- Levy-Lahad, Ephrat, Wilma Wasco, Parvoneh Poorkaj, Donna M. Romano, Junko Oshima, Warren H. Pettingell, Chang-en Yu, et al. 1995. « Candidate Gene for the Chromosome 1 Familial Alzheimer's Disease Locus ». *Science* 269 (5226): 973-77. <https://doi.org/10.1126/science.7638622>.
- Levy-Lahad, Ephrat, Ellen M. Wijsman, Ellen Nemens, Leojean Anderson, Katrina A. B. Goddard, James L. Weber, Thomas D. Bird, et Gerard D. Schellenberg. 1995. « A Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome 1 ». *Science* 269 (5226): 970-73. <https://doi.org/10.1126/science.7638621>.
- Lewis, J., D. W. Dickson, W. L. Lin, L. Chisholm, A. Corral, G. Jones, S. H. Yen, et al. 2001. « Enhanced Neurofibrillary Degeneration in Transgenic Mice Expressing Mutant Tau and APP ». *Science (New York, N.Y.)* 293 (5534): 1487-91. <https://doi.org/10.1126/science.1058189>.
- Li, Chuazhou, et Jürgen Götz. 2018. « Pyk2 Is a Novel Tau Tyrosine Kinase That Is Regulated by the Tyrosine Kinase Fyn ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 64 (1): 205-21. <https://doi.org/10.3233/JAD-180054>.
- Li, Huadong, Yi Deng, Kang Sun, Haibin Yang, Jie Liu, Meiling Wang, Zhang Zhang, et al. 2017. « Structural Basis of Kindlin-Mediated Integrin Recognition and Activation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (35): 9349-54. <https://doi.org/10.1073/pnas.1703064114>.
- Li, Q. X., S. Whyte, J. E. Tanner, G. Evin, K. Beyreuther, et C. L. Masters. 1998. « Secretion of Alzheimer's Disease Abeta Amyloid Peptide by Activated Human Platelets ». *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* 78 (4): 461-69.
- Li, Rena, Jie Cui, et Yong Shen. 2014. « Brain sex matters: Estrogen in cognition and Alzheimer's disease ». *Molecular and Cellular Endocrinology*, Beneficial Effect of Estrogens in the Brain and Cardiovascular System and Estrogen Effects in Brain and Heart, 389 (1): 13-21. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2013.12.018>.
- Li, Tong, Guojun Ma, Huaibin Cai, Donald L Price, et Philip C Wong. 2003. « Nicastrin Is Required for Assembly of Presenilin/γ-Secretase Complexes to Mediate Notch Signaling and for Processing and Trafficking of γ-Amyloid Precursor Protein in Mammals ».
- Li, Ya-Qing, Meng-Shan Tan, Hui-Fu Wang, Chen-Chen Tan, Wei Zhang, Zhan-Jie Zheng, Ling-Li Kong, et al. 2016. « Common Variant in PTK2B Is Associated with Late-Onset Alzheimer's Disease: A Replication Study and Meta-Analyses ». *Neuroscience Letters* 621 (mai): 83-87. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2016.04.020>.
- Li, Yonghe, Judy Cam, et Guojun Bu. 2001. « Low-Density Lipoprotein Receptor Family ». *Molecular Neurobiology* 23.
- Liebsch, Filip, Luka Kulic, Charlotte Teunissen, Adeola Shobo, Irem Ulku, Vivienne Engelschalt, Mark A. Hancock, et al. 2019. « Aβ34 Is a BACE1-Derived Degradation Intermediate Associated with Amyloid Clearance and Alzheimer's Disease Progression ». *Nature Communications* 10 (1): 2240. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-10152-w>.
- Lim, Ssang-Taek, Xiao Lei Chen, Yangmi Lim, Dan A. Hanson, Thanh-Trang Vo, Kyle Howerton, Nicholas Larocque, Susan J. Fisher, David D. Schlaepfer, et Dusko Illic. 2008. « Nuclear FAK Promotes Cell Proliferation and Survival through FERM-Enhanced p53 Degradation ». *Molecular Cell* 29 (1): 9-22. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2007.11.031>.
- Lim, Ssang-Taek, Nichol L.G. Miller, Ju-Ock Nam, Xiao Lei Chen, Yangmi Lim, et David D. Schlaepfer. 2010. « Pyk2 Inhibition of P53 as an Adaptive and Intrinsic Mechanism Facilitating Cell

- Proliferation and Survival ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (3): 1743-53.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M109.064212>.
- Lin, Eugene, Shih-Jen Tsai, Po-Hsiu Kuo, Yu-Li Liu, Albert C. Yang, et Chung-Feng Kao. 2017. « Association and Interaction Effects of Alzheimer's Disease-Associated Genes and Lifestyle on Cognitive Aging in Older Adults in a Taiwanese Population ». *Oncotarget* 8 (15): 24077-87.  
<https://doi.org/10.18632/oncotarget.15269>.
- Lin, X., G. Koelsch, S. Wu, D. Downs, A. Dashti, et J. Tang. 2000. « Human Aspartic Protease Memapsin 2 Cleaves the Beta-Secretase Site of Beta-Amyloid Precursor Protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (4): 1456-60. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.4.1456>.
- Ling, I-Fang, Todd E. Golde, Douglas R. Galasko, et Edward H. Koo. 2015. « Modulation of A $\beta$ 42 in vivo by  $\gamma$ -secretase modulator in primates and humans ». *Alzheimer's Research & Therapy* 7 (1): 55. <https://doi.org/10.1186/s13195-015-0137-y>.
- Ling, Yan, Kevin Morgan, et Noor Kalsheker. 2003. « Amyloid Precursor Protein (APP) and the Biology of Proteolytic Processing: Relevance to Alzheimer's Disease ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 35 (11): 1505-35. [https://doi.org/10.1016/s1357-2725\(03\)00133-x](https://doi.org/10.1016/s1357-2725(03)00133-x).
- Liu, Chia-Chen, Takahisa Kanekiyo, Huaxi Xu, et Guojun Bu. 2013. « Apolipoprotein E and Alzheimer Disease: Risk, Mechanisms and Therapy ». *Nature Reviews Neurology* 9 (2): 106-18.  
<https://doi.org/10.1038/nrneurol.2012.263>.
- Liu, Hsing-Cheng, Sy-Jye Leu, Jan-Gowth Chang, Shing-Ming Sung, Wei-Chen Hsu, Long-Shyong Lee, et Chaur-Jong Hu. 2003. « The association of beta-site APP cleaving enzyme (BACE) C786G polymorphism with Alzheimer's disease ». *Brain Research* 961 (1): 88-91.  
[https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(02\)03849-0](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(02)03849-0).
- Liu, Kangning, Ingrid Solano, David Mann, Cynthia Lemere, Marc Mercken, John Q. Trojanowski, et Virginia M.-Y. Lee. 2006. « Characterization of A $\beta$ 11-40/42 Peptide Deposition in Alzheimer's Disease and Young Down's Syndrome Brains: Implication of N-Terminally Truncated A $\beta$  Species in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 112 (2): 163-74. <https://doi.org/10.1007/s00401-006-0077-5>.
- Liu, Qiang, Celina V. Zerbinatti, Juan Zhang, Hyang-Sook Hoe, Baiping Wang, Sarah L. Cole, Joachim Herz, Louis Muglia, et Guojun Bu. 2007. « Amyloid Precursor Protein Regulates Brain Apolipoprotein E and Cholesterol Metabolism through Lipoprotein Receptor LRP1 ». *Neuron* 56 (1): 66-78. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2007.08.008>.
- Lleó, Alberto, Oksana Berezovska, John H. Growdon, et Bradley T. Hyman. 2004. « Clinical, Pathological, and Biochemical Spectrum of Alzheimer Disease Associated With PS-1 Mutations ». *The American Journal of Geriatric Psychiatry* 12 (2): 146-56.  
<https://doi.org/10.1097/00019442-200403000-00006>.
- Lopez-Perez, E., Y. Zhang, S. J. Frank, J. Creemers, N. Seidah, et F. Checler. 2001. « Constitutive Alpha-Secretase Cleavage of the Beta-Amyloid Precursor Protein in the Furin-Deficient LoVo Cell Line: Involvement of the pro-Hormone Convertase 7 and the Disintegrin Metalloprotease ADAM10 ». *Journal of Neurochemistry* 76 (5): 1532-39. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00180.x>.
- Lorenzen, Angela, Jonathan Samosh, Kenneth Vandewark, Pieter H. Anborgh, Claudia Seah, Ana C. Magalhaes, Sean P. Cregan, Stephen SG Ferguson, et Stephen H. Pasternak. 2010. « Rapid and Direct Transport of Cell Surface APP to the Lysosome defines a novel selective pathway ». *Molecular Brain* 3 (1): 11. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-3-11>.
- Louwensheimer, Eva, Alfredo Ramirez, Carlos Cruchaga, Tim Becker, Johannes Kornhuber, Oliver Peters, Stefanie Heilmann, et al. 2015. « The Influence of Genetic Variants in SORL1 Gene on

- the Manifestation of Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 36 (3): 1605.e13-1605.e20. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2014.12.007>.
- Lowenberg, K., et R. W. Waggoner. 1934. « FAMILIAL ORGANIC PSYCHOSIS (ALZHEIMER'S TYPE) ». *Archives of Neurology & Psychiatry* 31 (4): 737-54. <https://doi.org/10.1001/archneurpsyc.1934.02250040061004>.
- Lu, Daniel C., Shahrooz Rabizadeh, Sreeganga Chandra, Rana F. Shayya, Lisa M. Ellerby, Xin Ye, Guy S. Salvesen, Edward H. Koo, et Dale E. Bredesen. 2000. « A Second Cytotoxic Proteolytic Peptide Derived from Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor ». *Nature Medicine* 6 (4): 397-404. <https://doi.org/10.1038/74656>.
- Lu, Daniel C., Salvador Soriano, Dale E. Bredesen, et Edward H. Koo. 2003. « Caspase Cleavage of the Amyloid Precursor Protein Modulates Amyloid  $\beta$ -Protein Toxicity ». *Journal of Neurochemistry* 87 (3): 733-41. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2003.02059.x>.
- Luchsinger, José A, et Deborah R Gustafson. 2009. « Adiposity and Alzheimer's Disease ». *Current Opinion in Clinical Nutrition & Metabolic Care* 12 (1): 15-21. <https://doi.org/10.1097/MCO.0b013e32831c8c71>.
- Luchsinger, José A., Christiane Reitz, Bindu Patel, Ming-Xin Tang, Jennifer J. Manly, et Richard Mayeux. 2007. « Relation of Diabetes to Mild Cognitive Impairment ». *Archives of Neurology* 64 (4): 570-75. <https://doi.org/10.1001/archneur.64.4.570>.
- Lund, E. T., R. McKenna, D. B. Evans, S. K. Sharma, et W. R. Mathews. 2001. « Characterization of the in Vitro Phosphorylation of Human Tau by Tau Protein Kinase II (Cdk5/P20) Using Mass Spectrometry ». *Journal of Neurochemistry* 76 (4): 1221-32. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2001.00130.x>.
- Luo, Wen-jie, Hong Wang, Hongqiao Li, Benny S. Kim, Sanjiv Shah, Hahn-Jun Lee, Gopal Thinakaran, Tae-Wan Kim, Gang Yu, et Huaxi Xu. 2003. « PEN-2 and APH-1 Coordinately Regulate Proteolytic Processing of Presenilin 1 \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (10): 7850-54. <https://doi.org/10.1074/jbc.C200648200>.
- Mackenzie, Ian R. A. 2000. « Anti-inflammatory drugs and Alzheimer-type pathology in aging | Neurology ». 2000. <https://n.neurology.org/content/54/3/732.long>.
- Magara, Fulvio, Ulrike Müller, Zhi-Wei Li, Hans-Peter Lipp, Charles Weissmann, Marijana Stagljar, et David P. Wolfer. 1999. « Genetic background changes the pattern of forebrain commissure defects in transgenic mice underexpressing the  $\beta$ -amyloid-precursor protein ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96 (8): 4656-61. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.8.4656>.
- Mahley, Robert W. 1988. « Apolipoprotein E: Cholesterol Transport Protein with Expanding Role in Cell Biology ». *Science* 240 (4852): 622-30. <https://doi.org/10.1126/science.3283935>.
- Mahley, Robert W., Karl H. Weisgraber, et Yadong Huang. 2006. « Apolipoprotein E4: A Causative Factor and Therapeutic Target in Neuropathology, Including Alzheimer's Disease ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (15): 5644-51. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600549103>.
- Mairet-Coello, Georges, Julien Courchet, Simon Pieraut, Virginie Courchet, Anton Maximov, et Franck Polleux. 2013. « The CAMKK2-AMPK Kinase Pathway Mediates the Synaptotoxic Effects of A $\beta$  Oligomers through Tau Phosphorylation ». *Neuron* 78 (1): 94-108. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2013.02.003>.
- Malchiodi-Albedi, Fiorella, Maria Rosaria Domenici, Silvia Paradisi, Antonietta Bernardo, Maria Antonietta Ajmone-Cat, et Luisa Minghetti. 2001. « Astrocytes Contribute to Neuronal Impairment in  $\beta$ A Toxicity Increasing Apoptosis in Rat Hippocampal Neurons ». *Glia* 34 (1): 68-72. <https://doi.org/10.1002/glia.1041>.
- Maler, Juan Manuel, Hans-Wolfgang Klafki, Sabine Paul, Philipp Spitzer, Teja Wolfgang Groemer, Andreas Wolfram Henkel, Hermann Esselmann, Piotr Lewczuk, Johannes Kornhuber, et Jens



- Wiltfang. 2007. « Urea-Based Two-Dimensional Electrophoresis of Beta-Amyloid Peptides in Human Plasma: Evidence for Novel A $\beta$  Species ». *PROTEOMICS* 7 (20): 3815-20. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700311>.
- Maloney, Bryan, et Debomoy K. Lahiri. 2011. « The Alzheimer's Amyloid  $\beta$ -Peptide (A $\beta$ ) Binds a Specific DNA A $\beta$ -Interacting Domain (A $\beta$ ID) in the APP, BACE1, and APOE Promoters in a Sequence-Specific Manner: Characterizing a New Regulatory Motif ». *Gene* 488 (1-2): 1-12. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.06.004>.
- Maloney, Janice A., Travis Bainbridge, Amy Gustafson, Shuo Zhang, Roxanne Kyauk, Pascal Steiner, Marcel Van Der Brug, et al. 2014. « Molecular Mechanisms of Alzheimer Disease Protection by the A673T Allele of Amyloid Precursor Protein ». *Journal of Biological Chemistry* 289 (45): 30990-0. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.589069>.
- Manczak, Maria, Marcus J. Calkins, et P. Hemachandra Reddy. 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 ». *Human Molecular Genetics* 20 (13): 2495-2509. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr139>.
- Mandler, Markus, Lauren Walker, Radmila Santic, Peter Hanson, Ajeet Rijal Upadhaya, Sean J. Colloby, Christopher M. Morris, et al. 2014. « Pyroglutamylated Amyloid- $\beta$  Is Associated with Hyperphosphorylated Tau and Severity of Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 128 (1): 67-79. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1296-9>.
- Mann, D. M. A. 1988. « Alzheimer's Disease and Down's Syndrome ». *Histopathology* 13 (2): 125-37. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2559.1988.tb02018.x>.
- Mann, D. M. A., D. Jones, D. Prinja, et M. S. Purkiss. 1990. « The Prevalence of Amyloid (A4) Protein Deposits within the Cerebral and Cerebellar Cortex in Down's Syndrome and Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 80 (3): 318-27. <https://doi.org/10.1007/BF00294651>.
- Marambaud, Philippe, Nathalie Chevallier, Helene Barelli, Sherwin Wilk, et Frederic Checler. 1997. « Proteasome Contributes to the  $\alpha$ -Secretase Pathway of Amyloid Precursor Protein in Human Cells ». *Journal of Neurochemistry* 68 (2): 698-703. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68020698.x>.
- Marcusson, Eric G, Bruce F Horazdovsky, Joan Lin Cereghino, Editte Gharakhanian, et Scott D Emr. 1994. « The Sorting Receptor for Yeast Vacuolar Carboxypeptidase Y Is Encoded by the VFWO Gene ».
- Martin, Bronwyn L., Gesine Schrader-Fischer, Jorge Busciglio, Maraid Duke, Paolo Paganetti, et Bruce A. Yankner. 1995. « Intracellular Accumulation of  $\beta$ -Amyloid in Cells Expressing the Swedish Mutant Amyloid Precursor Protein (\*) ». *Journal of Biological Chemistry* 270 (45): 26727-30. <https://doi.org/10.1074/jbc.270.45.26727>.
- Marzolo, Maria-Paz, et Guojun Bu. 2009. « Lipoprotein Receptors and Cholesterol in APP Trafficking and Proteolytic Processing, Implications for Alzheimer's Disease ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (2): 191-200. <https://doi.org/10.1016/j.semcd.2008.10.005>.
- Maslah, Eliezer, Margaret Mallory, Lawrence Hansen, DeTeresa Richard, Michael Alford, et Robert Terry. 1994. « Synaptic and Neuritic Alterations during the Progression of Alzheimer's Disease ». *Neuroscience Letters* 174 (1): 67-72. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90121-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90121-X).
- Massey, Ashish C., Cong Zhang, et Ana Maria Cuervo. 2006. « Chaperone-Mediated Autophagy in Aging and Disease ». In *Current Topics in Developmental Biology*, 73:205-35. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)73007-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)73007-6).
- Masters, C L, G Simms, N A Weinman, G Multhaup, B L McDonald, et K Beyreuther. 1985. « Amyloid Plaque Core Protein in Alzheimer Disease and Down Syndrome. » *Proceedings of the National Academy of Sciences* 82 (12): 4245-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.82.12.4245>.

- Mastrangelo, Peter, Paul M. Mathews, M. Azhar Chishti, Stephen D. Schmidt, Yongjun Gu, Jing Yang, Matthew J. Mazzella, et al. 2005. « Dissociated phenotypes in presenilin transgenic mice define functionally distinct  $\gamma$ -secretases ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (25): 8972-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0500940102>.
- Mattson, M. P. 1997. « Cellular Actions of Beta-Amyloid Precursor Protein and Its Soluble and Fibrillogenic Derivatives ». *Physiological Reviews* 77 (4): 1081-1132. <https://doi.org/10.1152/physrev.1997.77.4.1081>.
- Mattson, P, Bin Cheng, Dave Davis, Karin Bryant, Ivan Lieberburg, et E Rydel. 1992. « P-Amyloid Peptides Destabilize Calcium Homeostasis and Render Human Cortical Neurons Vulnerable to Excitotoxicity ». *The Journal of Neuroscience*.
- Mattsson-Carlgrén, Niklas, Shorena Janelidze, Randall J. Bateman, Ruben Smith, Erik Stomrud, Geidy E. Serrano, Eric M. Reiman, et al. 2021. « Soluble P-Tau217 Reflects Amyloid and Tau Pathology and Mediates the Association of Amyloid with Tau ». *EMBO Molecular Medicine* 13 (6): e14022. <https://doi.org/10.15252/emmm.202114022>.
- Maust, Donovan T., Hyungjin Myra Kim, Lisa S. Seyfried, Claire Chiang, Janet Kavanagh, Lon S. Schneider, et Helen C. Kales. 2015. « Antipsychotics, Other Psychotropics, and the Risk of Death in Patients With Dementia: Number Needed to Harm ». *JAMA Psychiatry* 72 (5): 438-45. <https://doi.org/10.1001/jamapsychiatry.2014.3018>.
- May, Petra, Estelle Woldt, Rachel L. Matz, et Philippe Boucher. 2007. « The LDL receptor-related protein (LRP) family: An old family of proteins with new physiological functions ». *Annals of Medicine* 39 (3): 219-28. <https://doi.org/10.1080/07853890701214881>.
- Mayeux, R., et Y. Stern. 2012. « Epidemiology of Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (8): a006239-a006239. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006239>.
- McDermott, J R, et A M Gibson. 1996. « Degradation of Alzheimer's Beta-Amyloid Protein by Human Cathepsin D ». *Neuroreport* 7 (13): 2163-66. <https://doi.org/10.1097/00001756-199609020-00021>.
- McGeer, Patrick L., Jian Ping Guo, Moonhee Lee, Krista Kennedy, et Edith G. McGeer. 2018. « Alzheimer's Disease Can Be Spared by Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs ». *Journal of Alzheimer's Disease* 62 (3): 1219-22. <https://doi.org/10.3233/JAD-170706>.
- McGeer, Patrick L., Joseph Rogers, et Edith G. McGeer. 2006. « Inflammation, Anti-Inflammatory Agents and Alzheimer Disease: The Last 12 Years ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9 (3 Suppl): 271-76. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-9s330>.
- McGeer, P.L., T. Kawamata, et D.G. Walker. 1992. « Distribution of Clusterin in Alzheimer Brain Tissue ». *Brain Research* 579 (2): 337-41. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(92\)90071-G](https://doi.org/10.1016/0006-8993(92)90071-G).
- McKhann, Guy M., David S. Knopman, Howard Chertkow, Bradley T. Hyman, Clifford R. Jack, Claudia H. Kawas, William E. Klunk, et al. 2011. « The Diagnosis of Dementia Due to Alzheimer's Disease: Recommendations from the National Institute on Aging-Alzheimer's Association Workgroups on Diagnostic Guidelines for Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia* 7 (3): 263-69. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2011.03.005>.
- Meckler, Xavier, et Frédéric Checler. 2014. « Visualization of Specific  $\gamma$ -Secretase Complexes Using Bimolecular Fluorescence Complementation ». *Journal of Alzheimer's Disease* 40 (1): 161-76. <https://doi.org/10.3233/JAD-131268>.
- . 2016. « Presenilin 1 and Presenilin 2 Target  $\gamma$ -Secretase Complexes to Distinct Cellular Compartments ». *Journal of Biological Chemistry* 291 (24): 12821-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.708297>.
- Medina, Miguel, et Jesús Avila. 2014. « The Role of Extracellular Tau in the Spreading of Neurofibrillary Pathology ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8 (avril). <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00113>.

- Mega, M. S. 2000. « Cerebral Correlates of Psychotic Symptoms in Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry* 69 (2): 167-71.  
<https://doi.org/10.1136/jnnp.69.2.167>.
- Meißner, Julius N., Yvonne Bouter, et Thomas A. Bayer. 2015. « Neuron Loss and Behavioral Deficits in the TBA42 Mouse Model Expressing N-Truncated Pyroglutamate Amyloid- $\beta$  3–42 ». *Journal of Alzheimer's Disease* 45 (2): 471-82. <https://doi.org/10.3233/JAD-142868>.
- Menegon, Andrea, Ferran Burgaya, Pierre Baudot, David D Dunlap, Jean-Antoine Girault, et Flavia Valtorta. 1999. « FAK+ and PYK2/CAKb, Two Related Tyrosine Kinases Highly Expressed in the Central Nervous System: Similarities and Differences in the Expression Pattern ». *European Journal of Neuroscience*.
- Meng, Xiangfei, et Carl D'Arcy. 2012. « Education and Dementia in the Context of the Cognitive Reserve Hypothesis: A Systematic Review with Meta-Analyses and Qualitative Analyses ». Édité par Jerson Laks. *PLoS ONE* 7 (6): e38268.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0038268>.
- Meziane, H. 1998. « Memory-Enhancing Effects of Secreted Forms of the  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein in Normal and Amnesic Mice ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Miguel, Laetitia, Juliette Gervais, Gaël Nicolas, et Magalie Lecourtois. 2023. « SorLA Protective Function Is Restored by Improving SorLA Protein Maturation in a Subset of Alzheimer's Disease-Associated SORL1 Missense Variants ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 94 (4): 1343-49. <https://doi.org/10.3233/JAD-230211>.
- Miller, D. L., I. A. Papayannopoulos, J. Styles, S. A. Bobin, Y. Y. Lin, K. Biemann, et K. Iqbal. 1993. « Peptide Compositions of the Cerebrovascular and Senile Plaque Core Amyloid Deposits of Alzheimer's Disease ». *Archives of Biochemistry and Biophysics* 301 (1): 41-52.  
<https://doi.org/10.1006/abbi.1993.1112>.
- Mitra, Satyajit K., Daniel A. Hanson, et David D. Schlaepfer. 2005. « Focal Adhesion Kinase: In Command and Control of Cell Motility ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 6 (1): 56-68.  
<https://doi.org/10.1038/nrm1549>.
- Miyata, M., et J. D. Smith. 1996. « Apolipoprotein E Allele-Specific Antioxidant Activity and Effects on Cytotoxicity by Oxidative Insults and Beta-Amyloid Peptides ». *Nature Genetics* 14 (1): 55-61.  
<https://doi.org/10.1038/ng0996-55>.
- Modrego, Pedro, et Antonio Lobo. 2019. « A Good Marker Does Not Mean a Good Target for Clinical Trials in Alzheimer's Disease: The Amyloid Hypothesis Questioned ». *Neurodegenerative Disease Management* 9 (3): 119-21. <https://doi.org/10.2217/nmt-2019-0006>.
- Mogi, M., M. Harada, P. Riederer, H. Narabayashi, K. Fujita, et T. Nagatsu. 1994. « Tumor Necrosis Factor-Alpha (TNF-Alpha) Increases Both in the Brain and in the Cerebrospinal Fluid from Parkinsonian Patients ». *Neuroscience Letters* 165 (1-2): 208-10.  
[https://doi.org/10.1016/0304-3940\(94\)90746-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(94)90746-3).
- Mondragón-Rodríguez, Siddhartha, Emilie Trillaud-Doppia, Anthony Dudilot, Catherine Bourgeois, Michel Lauzon, Nicole Leclerc, et Jannic Boehm. 2012. « Interaction of Endogenous Tau Protein with Synaptic Proteins Is Regulated by N-Methyl-d-Aspartate Receptor-Dependent Tau Phosphorylation ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (38): 32040-53.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M112.401240>.
- Montagna, Elena, Mario M. Dorostkar, et Jochen Herms. 2017. « The Role of APP in Structural Spine Plasticity ». *Frontiers in Molecular Neuroscience* 10: 136.  
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2017.00136>.
- Monte, Suzanne M. de la. 2009. « Insulin Resistance and Alzheimer's Disease ». *BMB Reports* 42 (8): 475-81. <https://doi.org/10.5483/bmbrep.2009.42.8.475>.

- Moore, Brenda D., Jason Martin, Lorena De Mena, Jonatan Sanchez, Pedro E. Cruz, Carolina Ceballos-Diaz, Thomas B. Ladd, et al. 2018. « Short A $\beta$  Peptides Attenuate A $\beta$ 42 Toxicity in Vivo ». *Journal of Experimental Medicine* 215 (1): 283-301. <https://doi.org/10.1084/jem.20170600>.
- Moore, Steven, Lewis D. B. Evans, Therese Andersson, Erik Portelius, James Smith, Tatyana B. Dias, Nathalie Saurat, et al. 2015. « APP Metabolism Regulates Tau Proteostasis in Human Cerebral Cortex Neurons ». *Cell Reports* 11 (5): 689-96. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.03.068>.
- Morel, Etienne, Zeina Chamoun, Zofia M. Lasiecka, Robin B. Chan, Rebecca L. Williamson, Christopher Vetanovetz, Claudia Dall'Armi, et al. 2013. « Phosphatidylinositol-3-Phosphate Regulates Sorting and Processing of Amyloid Precursor Protein through the Endosomal System ». *Nature Communications* 4 (1): 2250. <https://doi.org/10.1038/ncomms3250>.
- Mori, H, K Takio, M Ogawara, et D. J. Selkoe. 1992. « Mass spectrometry of purified amyloid beta protein in Alzheimer's disease. » *Journal of Biological Chemistry* 267 (24): 17082-86. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)41896-0](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)41896-0).
- Morley, John E., et Susan A. Farr. 2014. « The Role of Amyloid-Beta in the Regulation of Memory ». *Biochemical Pharmacology* 88 (4): 479-85. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2013.12.018>.
- Morley, John E., Susan A. Farr, William A. Banks, Steven N. Johnson, Kelvin A. Yamada, et Lin Xu. 2010. « A Physiological Role for Amyloid-Beta Protein: Enhancement of Learning and Memory ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 19 (2): 441-49. <https://doi.org/10.3233/JAD-2009-1230>.
- Morris, John C., Catherine M. Roe, Chengjie Xiong, Anne M. Fagan, Alison M. Goate, David M. Holtzman, et Mark A. Mintun. 2010. « APOE Predicts Amyloid-Beta but Not Tau Alzheimer Pathology in Cognitively Normal Aging ». *Annals of Neurology* 67 (1): 122-31. <https://doi.org/10.1002/ana.21843>.
- Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, et al. 1997. « Cloning of a Disintegrin Metalloproteinase That Processes Precursor Tumour-Necrosis Factor-Alpha ». *Nature* 385 (6618): 733-36. <https://doi.org/10.1038/385733a0>.
- Muhammad, Alim, Ingrid Flores, Hong Zhang, Rui Yu, Agnieszka Staniszewski, Emmanuel Planel, Mathieu Herman, et al. 2008. « Retromer Deficiency Observed in Alzheimer's Disease Causes Hippocampal Dysfunction, Neurodegeneration, and A $\beta$  Accumulation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105 (20): 7327-32. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802545105>.
- Mullan, M., F. Crawford, K. Axelman, H. Houlden, L. Lilius, B. Winblad, et L. Lannfelt. 1992. « A Pathogenic Mutation for Probable Alzheimer's Disease in the APP Gene at the N-Terminus of Beta-Amyloid ». *Nature Genetics* 1 (5): 345-47. <https://doi.org/10.1038/ng0892-345>.
- Muller, U. C., et H. Zheng. 2012. « Physiological Functions of APP Family Proteins ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (2): a006288-a006288. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006288>.
- Müller, Ulrike C., Thomas Deller, et Martin Korte. 2017. « Not Just Amyloid: Physiological Functions of the Amyloid Precursor Protein Family ». *Nature Reviews. Neuroscience* 18 (5): 281-98. <https://doi.org/10.1038/nrn.2017.29>.
- Murayama, Ohoshi, Taisuke Tomita, Naomi Nihonmatsu, Miyuki Murayama, Xiaoyan Sun, Toshiyuki Honda, Takeshi Iwatsubo, et Akihiko Takashima. 1999. « Enhancement of amyloid  $\beta$  42 secretion by 28 different presenilin 1 mutations of familial Alzheimer's disease ». *Neuroscience Letters* 265 (1): 61-63. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(99\)00187-1](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(99)00187-1).
- Muresan, Zoia, et Virgil Muresan. 2007. « The Amyloid- $\beta$  Precursor Protein Is Phosphorylated via Distinct Pathways during Differentiation, Mitosis, Stress, and Degeneration » *D*. *Molecular Biology of the Cell* 18.
- Mzhavia, N., Y.I. Berman, Y. Qian, L. Yan, et L.a. Devi. 1999. « Cloning, Expression, and Characterization of Human Metalloprotease 1: A Novel Member of the Pitrilysin Family of

- Metalloendoproteases ». *DNA and Cell Biology* 18 (5): 369-80.  
<https://doi.org/10.1089/104454999315268>.
- Nagy, Z., K. A. Jobst, M. M. Esiri, J. H. Morris, E. M. King, B. MacDonald, S. Litchfield, L. Barnetson, et A. D. Smith. 1996. « Hippocampal Pathology Reflects Memory Deficit and Brain Imaging Measurements in Alzheimer's Disease: Clinicopathologic Correlations Using Three Sets of Pathologic Diagnostic Criteria ». *Dementia (Basel, Switzerland)* 7 (2): 76-81.  
<https://doi.org/10.1159/000106857>.
- Naj, Adam C., Gerard D. Schellenberg, et Alzheimer's Disease Genetics Consortium (ADGC). 2017. « Genomic Variants, Genes, and Pathways of Alzheimer's Disease: An Overview ». *American Journal of Medical Genetics. Part B, Neuropsychiatric Genetics: The Official Publication of the International Society of Psychiatric Genetics* 174 (1): 5-26.  
<https://doi.org/10.1002/ajmg.b.32499>.
- Nakamura, Yu, Masatoshi Takeda, Hideo Suzuki, Hitoshi Morita, Kunitoshi Tada, Shiro Hariguchi, et Tsuyoshi Nishimura. 1989. « Lysosome instability in aged rat brain ». *Neuroscience Letters* 97 (1): 215-20. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(89\)90166-3](https://doi.org/10.1016/0304-3940(89)90166-3).
- Nakanishi, Hiroshi, Tutomu Amano, Dewi F. Sastradipura, Yoshito Yoshimine, Takayuki Tsukuba, Kazunari Tanabe, Ichirou Hirotsu, Tomochika Ohono, et Kenji Yamamoto. 1997. « Increased Expression of Cathepsins E and D in Neurons of the Aged Rat Brain and Their Colocalization with Lipofuscin and Carboxy-Terminal Fragments of Alzheimer Amyloid Precursor Protein ». *Journal of Neurochemistry* 68 (2): 739-49. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.1997.68020739.x>.
- Nakanishi, Hiroshi, Kazuyoshi Tominaga, Tutomu Amano, Ichirou Hirotsu, Teruyoshi Inoue, et Kenji Yamamoto. 1994. « Age-Related Changes in Activities and Localizations of Cathepsins D, E, B, and L in the Rat Brain Tissues ». *Experimental Neurology* 126 (1): 119-28.  
<https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1048>.
- Namba, Yoshio, Masanori Tomonaga, Hiroshi Kawasaki, Eiichi Otomo, et Kazuhiko Ikeda. 1991. « Apolipoprotein E Immunoreactivity in Cerebral Amyloid Deposits and Neurofibrillary Tangles in Alzheimer's Disease and Kuru Plaque Amyloid in Creutzfeldt-Jakob Disease ». *Brain Research* 541 (1): 163-66. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(91\)91092-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(91)91092-F).
- Naser, Rayan, Abdullah Aldehaiman, Escarlet Díaz-Galicia, et Stefan Arold. 2018. « Endogenous Control Mechanisms of FAK and PYK2 and Their Relevance to Cancer Development ». *Cancers* 10 (6): 196. <https://doi.org/10.3390/cancers10060196>.
- Nathan, B. P., S. Bellosta, D. A. Sanan, K. H. Weisgraber, R. W. Mahley, et R. E. Pitas. 1994. « Differential Effects of Apolipoproteins E3 and E4 on Neuronal Growth in Vitro ». *Science (New York, N.Y.)* 264 (5160): 850-52. <https://doi.org/10.1126/science.8171342>.
- Naus, Silvia, Simone Reipschläger, Dirk Wildeboer, Stefan F. Lichtenthaler, Stefan Mitterreiter, Ziqiang Guan, Marcia L. Moss, et Jörg W. Bartsch. 2006. « Identification of Candidate Substrates for Ectodomain Shedding by the Metalloprotease-Disintegrin ADAM8 ». *Biological Chemistry* 387 (3). <https://doi.org/10.1515/BC.2006.045>.
- Nayeri, Tooran, Shahabeddin Sarvi, Mehdi Sharif, et Ahmad Daryani. 2021. « Toxoplasma gondii: A possible etiologic agent for Alzheimer's disease ». *Heliyon* 7 (6): e07151.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07151>.
- Nettiksimmons, Jasmine, Gregory Tranah, Daniel S. Evans, Jennifer S. Yokoyama, et Kristine Yaffe. 2016. « Gene-Based Aggregate SNP Associations between Candidate AD Genes and Cognitive Decline ». *AGE* 38 (2): 41. <https://doi.org/10.1007/s11357-016-9885-2>.
- Nhan, Hoang S., Karen Chiang, et Edward H. Koo. 2015. « The Multifaceted Nature of Amyloid Precursor Protein and Its Proteolytic Fragments: Friends and Foes ». *Acta Neuropathologica* 129 (1): 1-19. <https://doi.org/10.1007/s00401-014-1347-2>.

- Nicolas, G., C. Charbonnier, D. Wallon, O. Quenez, C. Bellenguez, B. Grenier-Boley, S. Rousseau, et al. 2016. « SORL1 Rare Variants: A Major Risk Factor for Familial Early-Onset Alzheimer's Disease ». *Molecular Psychiatry* 21 (6): 831-36. <https://doi.org/10.1038/mp.2015.121>.
- Nicolas, Gaël, David Wallon, Camille Charbonnier, Olivier Quenez, Stéphane Rousseau, Anne-Claire Richard, Anne Rovelet-Lecrux, et al. 2016. « Screening of Dementia Genes by Whole-Exome Sequencing in Early-Onset Alzheimer Disease: Input and Lessons ». *European Journal of Human Genetics* 24 (5): 710-16. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.173>.
- Nielsen, Morten S., Camilla Gustafsen, Peder Madsen, Jens R. Nyengaard, Guido Hermeijer, Oddmund Bakke, Muriel Mari, et al. 2007. « Sorting by the Cytoplasmic Domain of the Amyloid Precursor Protein Binding Receptor SorLA ». *Molecular and Cellular Biology* 27 (19): 6842-51. <https://doi.org/10.1128/MCB.00815-07>.
- Niimura, Manabu, Noriko Isoo, Nobumasa Takasugi, Makiko Tsuruoka, Kumiko Ui-Tei, Kaoru Saigo, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, et Takeshi Iwatsubo. 2005. « Aph-1 Contributes to the Stabilization and Trafficking of the  $\gamma$ -Secretase Complex through Mechanisms Involving Intermolecular and Intramolecular Interactions \* ». *Journal of Biological Chemistry* 280 (13): 12967-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.M409829200>.
- Nilsberth, Camilla, Anita Westlind-Danielsson, Christopher B. Eckman, Margaret M. Condron, Karin Axelman, Charlotte Forsell, Charlotte Stenh, et al. 2001. « The "Arctic" APP Mutation (E693G) Causes Alzheimer's Disease by Enhanced A $\beta$  Protofibril Formation ». *Nature Neuroscience* 4 (9): 887-93. <https://doi.org/10.1038/nn0901-887>.
- Nilselid, A.-M., Pia Davidsson, Katarina Nägga, Niels Andreasen, Pam Fredman, et Kaj Blennow. 2006. « Clusterin in Cerebrospinal Fluid: Analysis of Carbohydrates and Quantification of Native and Glycosylated Forms ». *Neurochemistry International* 48 (8): 718-28. <https://doi.org/10.1016/j.neuint.2005.12.005>.
- Nixon, Ralph A. 2017. « Amyloid Precursor Protein and Endosomal-Lysosomal Dysfunction in Alzheimer's Disease: Inseparable Partners in a Multifactorial Disease ». *The FASEB Journal* 31 (7): 2729-43. <https://doi.org/10.1096/fj.201700359>.
- Noble, Wendy, Vicki Olm, Kazuyuki Takata, Evelyn Casey, O Mary, Jordana Meyerson, Kate Gaynor, et al. 2003. « Cdk5 Is a Key Factor in Tau Aggregation and Tangle Formation In Vivo ». *Neuron* 38 (4): 555-65. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(03\)00259-9](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(03)00259-9).
- Nordstedt, C., G. L. Caporaso, J. Thyberg, S. E. Gandy, et P. Greengard. 1993. « Identification of the Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein in clathrin-coated vesicles purified from PC12 cells. ». *Journal of Biological Chemistry* 268 (1): 608-12. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)54194-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)54194-6).
- Nunan, Janelle, Mark S. Shearman, Frédéric Checler, Roberto Cappai, Geneviève Evin, Konrad Beyreuther, Colin L. Masters, et David H. Small. 2001. « The C-terminal Fragment of the Alzheimer's Disease Amyloid Protein Precursor Is Degraded by a Proteasome-dependent Mechanism Distinct from  $\Gamma$ -secretase ». *European Journal of Biochemistry* 268 (20): 5329-36. <https://doi.org/10.1046/j.0014-2956.2001.02465.x>.
- Nunan, Janelle, et David H. Small. 2002. « Proteolytic Processing of the Amyloid-Beta Protein Precursor of Alzheimer's Disease ». *Essays in Biochemistry* 38: 37-49. <https://doi.org/10.1042/bse0380037>.
- Nunomura, Akihiko, George Perry, Gjumrakch Aliev, Keisuke Hirai, Atsushi Takeda, Elizabeth K. Balraj, Paul K. Jones, et al. 2001. « Oxidative Damage Is the Earliest Event in Alzheimer Disease ». *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* 60 (8): 759-67. <https://doi.org/10.1093/jnen/60.8.759>.
- Nussbaum, Justin M., Stephan Schilling, Holger Cynis, Antonia Silva, Eric Swanson, Tanaporn Wangsanut, Kaycie Tayler, et al. 2012. « Prion-like Behaviour and Tau-Dependent



- Cytotoxicity of Pyroglutamylated Amyloid- $\beta$  ». *Nature* 485 (7400): 651-55.  
<https://doi.org/10.1038/nature11060>.
- Nyabi, Omar, Mostafa Bentahir, Katrien Horré, An Herreman, Numa Gottardi-Littell, Christine Van Broeckhoven, Pascal Merchiers, Kurt Spittaels, Wim Annaert, et Bart De Strooper. 2003. « Presenilins Mutated at Asp-257 or Asp-385 Restore Pen-2 Expression and Nicastrin Glycosylation but Remain Catalytically Inactive in the Absence of Wild Type Presenilin \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (44): 43430-36.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M306957200>.
- Nyborg, Andrew C, Thomas B Ladd, Craig W Zwizinski, James J Lah, et Todd E Golde. 2006. « Sortilin, SorCS1b, and SorLA Vps10p Sorting Receptors, Are Novel  $\gamma$ -Secretase Substrates ». *Molecular Neurodegeneration* 1 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-3>.
- Obregon, Demian, Huayan Hou, Juan Deng, Brian Giunta, Jun Tian, Donna Darlington, Md Shahaduzzaman, et al. 2012. « Soluble Amyloid Precursor Protein- $\alpha$  Modulates  $\beta$ -Secretase Activity and Amyloid- $\beta$  Generation ». *Nature Communications* 3 (1): 777.  
<https://doi.org/10.1038/ncomms1781>.
- Oddo, Salvatore, Antonella Caccamo, Jason D. Shepherd, M. Paul Murphy, Todd E. Golde, Rakez Kaye, Raju Metherate, Mark P. Mattson, Yama Akbari, et Frank M. LaFerla. 2003. « Triple-Transgenic Model of Alzheimer's Disease with Plaques and Tangles: Intracellular Abeta and Synaptic Dysfunction ». *Neuron* 39 (3): 409-21. [https://doi.org/10.1016/s0896-6273\(03\)00434-3](https://doi.org/10.1016/s0896-6273(03)00434-3).
- Offe, Katrin, Sara E. Dodson, James T. Shoemaker, Jason J. Fritz, Marla Gearing, Allan I. Levey, et James J. Lah. 2006. « The Lipoprotein Receptor LR11 Regulates Amyloid  $\beta$  Production and Amyloid Precursor Protein Traffic in Endosomal Compartments ». *The Journal of Neuroscience* 26 (5): 1596-1603. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4946-05.2006>.
- Ohsawa, Ikuroh, Chizuko Takamura, Takako Morimoto, Mariko Ishiguro, et Shinichi Kohsaka. 1999. « Amino-terminal Region of Secreted Form of Amyloid Precursor Protein Stimulates Proliferation of Neural Stem Cells ». *European Journal of Neuroscience* 11 (6): 1907-13.  
<https://doi.org/10.1046/j.1460-9568.1999.00601.x>.
- Ohyagi, Yasumasa, Hideaki Asahara, De-Hua Chui, Yuko Tsuruta, Nobutaka Sakae, Katsue Miyoshi, Takeshi Yamada, et al. 2005. « Intracellular A $\beta$ 42 Activates P53 Promoter: A Pathway to Neurodegeneration in Alzheimer's Disease ». *The FASEB Journal* 19 (2): 1-29.  
<https://doi.org/10.1096/fj.04-2637fje>.
- Okada, Hirokazu, Wenzhu Zhang, Corrinne Peterhoff, Jeremy C. Hwang, Ralph A. Nixon, Sung H. Ryu, et Tae-Wan Kim. 2010. « Proteomic Identification of Sorting Nexin 6 as a Negative Regulator of BACE1-Mediated APP Processing ». *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 24 (8): 2783-94. <https://doi.org/10.1096/fj.09-146357>.
- Okigaki, M., C. Davis, M. Falasca, S. Harroch, D. P. Felsenfeld, M. P. Sheetz, et J. Schlessinger. 2003. « Pyk2 Regulates Multiple Signaling Events Crucial for Macrophage Morphology and Migration ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100 (19): 10740-45.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1834348100>.
- Osenkowski, Pamela, Hua Li, Wenjuan Ye, Dongyang Li, Lorene Aeschbach, Patrick C. Fraering, Michael S. Wolfe, Dennis J. Selkoe, et Huilin Li. 2009. « Cryoelectron Microscopy Structure of Purified  $\gamma$ -Secretase at 12 Å Resolution ». *Journal of Molecular Biology* 385 (2): 642-52.  
<https://doi.org/10.1016/j.jmb.2008.10.078>.
- Østergaard, Leif, Rasmus Aamand, Eugenio Gutiérrez-Jiménez, Yi-Ching L. Ho, Jakob U. Blicher, Søren M. Madsen, Kartheeban Nagenthiraja, et al. 2013. « The Capillary Dysfunction Hypothesis of Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 34 (4): 1018-31.  
<https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.09.011>.

- Ott, M. O., et S. L. Bullock. 2001. « A Gene Trap Insertion Reveals That Amyloid Precursor Protein Expression Is a Very Early Event in Murine Embryogenesis ». *Development Genes and Evolution* 211 (7): 355-57. <https://doi.org/10.1007/s004270100158>.
- Paik, Seung R, Ju-Hyun Lee, Do-Hyung Kim, Chung-Soon Chang, et Young-Sik Kim. 1998. « Self-Oligomerization of NACP, the Precursor Protein of the Non-Amyloid L/A4 Protein (AL) Component of Alzheimer's Disease Amyloid, Observed in the Presence of a C-Terminal AL Fragment (Residues 25<sup>^</sup>35) ». *FEBS Letters*.
- Paiva, Isabel, Lucrezia Cellai, Céline Meriaux, Lauranne Poncelet, Ouada Nebie, Jean-Michel Saliou, Anne-Sophie Lacoste, et al. 2022. « Caffeine Intake Exerts Dual Genome-Wide Effects on Hippocampal Metabolism and Learning-Dependent Transcription ». *Journal of Clinical Investigation* 132 (12): e149371. <https://doi.org/10.1172/JCI149371>.
- Pant, Saumya, Mahak Sharma, Kruti Patel, Steve Caplan, Chavela M. Carr, et Barth D. Grant. 2009. « AMPH-1/Amphiphysin/Bin1 Functions with RME-1/Ehd1 in Endocytic Recycling ». *Nature Cell Biology* 11 (12): 1399-1410. <https://doi.org/10.1038/ncb1986>.
- Panza, Francesco, Madia Lozupone, Giancarlo Logroscino, et Bruno P. Imbimbo. 2019. « A Critical Appraisal of Amyloid- $\beta$ -Targeting Therapies for Alzheimer Disease ». *Nature Reviews Neurology* 15 (2): 73-88. <https://doi.org/10.1038/s41582-018-0116-6>.
- Pardossi-Piquard, R., J. Dunys, G. Yu, P. St. George-Hyslop, C. Alves da Costa, et F. Checler. 2006. « Nephilysin Activity and Expression Are Controlled by Nicastrin ». *Journal of Neurochemistry* 97 (4): 1052-56. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2006.03822.x>.
- Pardossi-Piquard, R., I. Lauritzen, C. Bauer, G. Sacco, P. Robert, et F. Checler. 2016. « Influence of Genetic Background on Apathy-Like Behavior in Triple Transgenic AD Mice ». *Current Alzheimer Research* 13 (8): 942-49.
- Pardossi-Piquard, Raphaëlle, et Frédéric Checler. 2012. « The Physiology of the B-amyloid Precursor Protein Intracellular Domain AICD ». *Journal of Neurochemistry* 120 (s1): 109-24. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07475.x>.
- Pardossi-Piquard, Raphaëlle, Julie Dunys, Emilie Giaime, Marie-Victoire Guillot-Sestier, Peter St. George-Hyslop, Frédéric Checler, et Cristine Alves Da Costa. 2009. « p53-Dependent Control of Cell Death by Nicastrin: Lack of Requirement for Presenilin-dependent  $\Gamma$ -secretase Complex ». *Journal of Neurochemistry* 109 (1): 225-37. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05952.x>.
- Pardossi-Piquard, Raphaëlle, Agnès Petit, Toshitaka Kawarai, Claire Sunyach, Cristine Alves Da Costa, Bruno Vincent, Sabine Ring, et al. 2005. « Presenilin-Dependent Transcriptional Control of the A $\beta$ -Degrading Enzyme Nephilysin by Intracellular Domains of  $\beta$ APP and APLP ». *Neuron* 46 (4): 541-54. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2005.04.008>.
- Park, Hyejin, Tae-In Kam, Youngdoo Kim, Hyunwoo Choi, Youngdae Gwon, Changsoo Kim, Jae-Young Koh, et Yong-Keun Jung. 2012. « Neuropathogenic Role of Adenylate Kinase-1 in A $\beta$ -Mediated Tau Phosphorylation via AMPK and GSK3 $\beta$  ». *Human Molecular Genetics* 21 (12): 2725-37. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds100>.
- Parvathy, S., Sylvester Y. Oppong, Eric H. Karran, Derek R. Buckle, Anthony J. Turner, et Nigel M. Hooper. 1997. « Angiotensin-Converting Enzyme Secretase Is Inhibited by Zinc Metalloprotease Inhibitors and Requires Its Substrate to Be Inserted in a Lipid Bilayer ». *Biochemical Journal* 327 (1): 37-43. <https://doi.org/10.1042/bj3270037>.
- Pathak, Divya, Amandine Berthet, et Ken Nakamura. 2013. « Energy Failure: Does It Contribute to Neurodegeneration? ». *Annals of Neurology* 74 (4): 506-16. <https://doi.org/10.1002/ana.24014>.
- Pavlov, Pavel F., Birgitta Wiehager, Jun Sakai, Susanne Frykman, Homira Behbahani, Bengt Winblad, et Maria Ankarcrona. 2011. « Mitochondrial  $\gamma$ -Secretase Participates in the Metabolism of

- Mitochondria-Associated Amyloid Precursor Protein ». *The FASEB Journal* 25 (1): 78-88. <https://doi.org/10.1096/fj.10-157230>.
- Pera, Marta, Daniel Alcolea, Raquel Sánchez-Valle, Cristina Guardia-Laguarta, Martí Colom-Cadena, Nahuai Badiola, Marc Suárez-Calvet, et al. 2013. « Distinct Patterns of APP Processing in the CNS in Autosomal-Dominant and Sporadic Alzheimer Disease ». *Acta Neuropathologica* 125 (2): 201-13. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-1062-9>.
- Peraus, Gisela C, Colin L Masters, et Konrad Beyreuther. 1997. « Late Compartments of Amyloid Precursor Protein Transport in SY5Y Cells Are Involved in  $\beta$ -Amyloid Secretion ».
- Pereira, Joana B, Rik Ossenkoppele, Sebastian Palmqvist, Tor Olof Strandberg, Ruben Smith, Eric Westman, et Oskar Hansson. 2019. « Amyloid and tau accumulate across distinct spatial networks and are differentially associated with brain connectivity ». Édité par Muireann Irish et Timothy E Behrens. *eLife* 8 (décembre): e50830. <https://doi.org/10.7554/eLife.50830>.
- Perez, Ruth G., Salvador Soriano, Jay D. Hayes, Beth Ostaszewski, Weiming Xia, Dennis J. Selkoe, Xiaohua Chen, Gorazd B. Stokin, et Edward H. Koo. 1999. « Mutagenesis Identifies New Signals for  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Endocytosis, Turnover, and the Generation of Secreted Fragments, Including  $A\beta_{42}^*$  ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (27): 18851-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.18851>.
- Perez, Ruth G., Hui Zheng, Lex H. T. Van der Ploeg, et Edward H. Koo. 1997. « The  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein of Alzheimer's Disease Enhances Neuron Viability and Modulates Neuronal Polarity ». *The Journal of Neuroscience* 17 (24): 9407-14. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.17-24-09407.1997>.
- Pericak-Vance, M. A., et A. J. Carrano. 1991. « International Workshop of Chromosome 19 ». DOE/ER/61044-1; CONF-9008226-Summ. Duke Univ. Medical Center, Durham, NC (United States). Div. of Neurology. <https://www.osti.gov/biblio/6263027>.
- Peters, Christian, Denisse Bascuñán, Carlos Opazo, et Luis G. Aguayo. 2016. « Differential Membrane Toxicity of Amyloid- $\beta$  Fragments by Pore Forming Mechanisms ». *Journal of Alzheimer's Disease* 51 (3): 689-99. <https://doi.org/10.3233/JAD-150896>.
- Peters, Ruth, Nigel Beckett, Francoise Forette, Jaakko Tuomilehto, Robert Clarke, Craig Ritchie, Adam Waldman, et al. 2008. « Incident dementia and blood pressure lowering in the Hypertension in the Very Elderly Trial cognitive function assessment (HYVET-COG): a double-blind, placebo controlled trial ». *The Lancet Neurology* 7 (8): 683-89. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70143-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70143-1).
- Petersen, Claus M., Morten S. Nielsen, Anders Nykjær, Linda Jacobsen, Niels Tommerup, Hanne H. Rasmussen, Hans Røigaard, Jørgen Gliemann, Peder Madsen, et Søren K. Moestrup. 1997. « Molecular Identification of a Novel Candidate Sorting Receptor Purified from Human Brain by Receptor-associated Protein Affinity Chromatography\* ». *Journal of Biological Chemistry* 272 (6): 3599-3605. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.6.3599>.
- Petersen, R. C. 2004. « Mild Cognitive Impairment as a Diagnostic Entity ». *Journal of Internal Medicine* 256 (3): 183-94. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2004.01388.x>.
- Petersen, R. C., G. E. Smith, S. C. Waring, R. J. Ivnik, E. G. Tangalos, et E. Kokmen. 1999. « Mild Cognitive Impairment: Clinical Characterization and Outcome ». *Archives of Neurology* 56 (3): 303-8. <https://doi.org/10.1001/archneur.56.3.303>.
- Piedrahita, Diego, Israel Hernández, Alejandro López-Tobón, Dmitry Fedorov, Boguslaw Obara, B. S. Manjunath, Ryan L. Boudreau, et al. 2010. « Silencing of CDK5 Reduces Neurofibrillary Tangles in Transgenic Alzheimer's Mice ». *The Journal of Neuroscience* 30 (42): 13966-76. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3637-10.2010>.
- Pietrzik, Claus U., et Sebastian Jaeger. 2008. « Functional Role of Lipoprotein Receptors in Alzheimers Disease ». *Current Alzheimer Research* 5 (1): 15-25.

- Pike, C. J., B. J. Cummings, et C. W. Cotman. 1992. « Beta-Amyloid Induces Neuritic Dystrophy in Vitro: Similarities with Alzheimer Pathology ». *Neuroreport* 3 (9): 769-72. <https://doi.org/10.1097/00001756-199209000-00012>.
- Pike, Christian J., Brian J. Cummings, et Carl W. Cotman. 1995. « Early Association of Reactive Astrocytes with Senile Plaques in Alzheimer's Disease ». *Experimental Neurology* 132 (2): 172-79. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(95\)90022-5](https://doi.org/10.1016/0014-4886(95)90022-5).
- Pike, Christian J, Andrea J Walencewicz, Charles G Glabe, et Carl W Cotman. 1991. « In Vitro Aging of 13-Amyloid Protein Causes Peptide Aggregation and Neurotoxicity ».
- Pinho, Catarina Moreira, Pedro Filipe Teixeira, et Elzbieta Glaser. 2014. « Mitochondrial Import and Degradation of Amyloid- $\beta$  Peptide ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1837 (7): 1069-74. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.02.007>.
- Plant, Leigh D, John P Boyle, Ian F Smith, Chris Peers, et Hugh A Pearson. 2003. « The Production of Amyloid  $\beta$  Peptide Is a Critical Requirement for the Viability of Central Neurons ».
- Plum, Leona, Markus Schubert, et Jens C. Brüning. 2005. « The Role of Insulin Receptor Signaling in the Brain ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 16 (2): 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2005.01.008>.
- Poirel, Odile, Sébastien Mella, Catherine Videau, Lauriane Ramet, Maria Antonietta Davoli, Etienne Herzog, Pavel Katsel, et al. 2018. « Moderate Decline in Select Synaptic Markers in the Prefrontal Cortex (BA9) of Patients with Alzheimer's Disease at Various Cognitive Stages ». *Scientific Reports* 8 (1): 938. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19154-y>.
- Polydoro, Manuela, Volodymyr I. Dzhala, Amy M. Pooler, Samantha B. Nicholls, A. Patrick McKinney, Laura Sanchez, Rose Pitstick, et al. 2014. « Soluble Pathological Tau in the Entorhinal Cortex Leads to Presynaptic Deficits in an Early Alzheimer's Disease Model ». *Acta Neuropathologica* 127 (2): 257-70. <https://doi.org/10.1007/s00401-013-1215-5>.
- Portelius, Erik, Nenad Bogdanovic, Mikael K. Gustavsson, Inga Volkman, Gunnar Brinkmalm, Henrik Zetterberg, Bengt Winblad, et Kaj Blennow. 2010. « Mass Spectrometric Characterization of Brain Amyloid Beta Isoform Signatures in Familial and Sporadic Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 120 (2): 185-93. <https://doi.org/10.1007/s00401-010-0690-1>.
- Pottier, C., D. Hannequin, S. Coutant, A. Rovelet-Lecrux, D. Wallon, S. Rousseau, S. Legallic, et al. 2012. « High Frequency of Potentially Pathogenic SORL1 Mutations in Autosomal Dominant Early-Onset Alzheimer Disease ». *Molecular Psychiatry* 17 (9): 875-79. <https://doi.org/10.1038/mp.2012.15>.
- Pottier, Cyril, David Wallon, Anne Rovelet Lecrux, David Maltete, Stephanie Bombois, Snejana Jurici, Thierry Frebourg, Didier Hannequin, et Dominique Campion. 2012. « Amyloid- $\beta$  Protein Precursor Gene Expression in Alzheimer's Disease and Other Conditions ». *Journal of Alzheimer's Disease* 28 (3): 561-66. <https://doi.org/10.3233/JAD-2011-111148>.
- Profenno, Louis A., Anton P. Porsteinsson, et Stephen V. Faraone. 2010. « Meta-Analysis of Alzheimer's Disease Risk with Obesity, Diabetes, and Related Disorders ». *Biological Psychiatry* 67 (6): 505-12. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.02.013>.
- Prokop, Stefan, Christian Haass, et Harald Steiner. 2005. « Length and Overall Sequence of the PEN-2 C-Terminal Domain Determines Its Function in the Stabilization of Presenilin Fragments ». *Journal of Neurochemistry* 94 (1): 57-62. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03165.x>.
- Pucci, S., C. Greggi, C. Polidoro, M. C. Piro, M. Celi, M. Feola, E. Gasbarra, et al. 2019. « Clusterin Silencing Restores Myoblasts Viability and down Modulates the Inflammatory Process in Osteoporotic Disease ». *Journal of Translational Medicine* 17 (1): 118. <https://doi.org/10.1186/s12967-019-1868-5>.
- Puig, Kendra L., et Colin K. Combs. 2013. « Expression and Function of APP and Its Metabolites Outside the Central Nervous System ». *Experimental Gerontology* 48 (7): 608-11. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2012.07.009>.

- Pulina, Maria V., Maya Hopkins, Vahram Haroutunian, Paul Greengard, et Victor Bustos. 2020. « C99 Selectively Accumulates in Vulnerable Neurons in Alzheimer's Disease ». *Alzheimer's & Dementia* 16 (2): 273-82. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2019.09.002>.
- Puzzo, Daniela, Lucia Privitera, Elena Leznik, Mauro Fà, Agnieszka Staniszewski, Agostino Palmeri, et Ottavio Arancio. 2008. « Picomolar Amyloid- $\beta$  Positively Modulates Synaptic Plasticity and Memory in Hippocampus ». *The Journal of Neuroscience* 28 (53): 14537-45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2692-08.2008>.
- Qi-Takahara, Yue, Maho Morishima-Kawashima, Yu Tanimura, Georgia Dolios, Naoko Hirotsu, Yuko Horikoshi, Fuyuki Kametani, et al. 2005. « Longer Forms of Amyloid  $\beta$  Protein: Implications for the Mechanism of Intramembrane Cleavage by  $\gamma$ -Secretase ». *The Journal of Neuroscience* 25 (2): 436-45. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1575-04.2005>.
- Qiu, Chengxuan. 2011. « Epidemiological findings of vascular risk factors in Alzheimer's disease: implications for therapeutic and preventive intervention ». *Expert Review of Neurotherapeutics* 11 (11): 1593-1607. <https://doi.org/10.1586/ern.11.146>.
- Querfurth, Henry W., et Frank M. LaFerla. 2010. « Alzheimer's Disease ». *New England Journal of Medicine* 362 (4): 329-44. <https://doi.org/10.1056/NEJMra0909142>.
- Raber, Jacob, Derek Wong, Manuel Buttini, Matthias Orth, Stefano Bellosa, Robert E. Pitas, Robert W. Mahley, et Lennart Mucke. 1998. « Isoform-Specific Effects of Human Apolipoprotein E on Brain Function Revealed in ApoE Knockout Mice: Increased Susceptibility of Females ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95 (18): 10914-19. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.18.10914>.
- Rajendran, Lawrence, Masanori Honsho, Tobias R. Zahn, Patrick Keller, Kathrin D. Geiger, Paul Verkade, et Kai Simons. 2006. « Alzheimer's disease  $\beta$ -amyloid peptides are released in association with exosomes ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (30): 11172-77. <https://doi.org/10.1073/pnas.0603838103>.
- Ramaker, Jenna M., et Philip F. Copenhagen. 2017. « Amyloid Precursor Protein Family as Unconventional Go-Coupled Receptors and the Control of Neuronal Motility ». *Neurogenesis* 4 (1): e1288510. <https://doi.org/10.1080/23262133.2017.1288510>.
- Ranaldi, Sébastien, Céline Caillava, Sylvie Promé, Laetitia Rubrecht, Sandra Cobo, Nicolas Salvétat, Emilie Du Paty, et al. 2013. « N-Truncated A $\beta$  Peptides in Complex Fluids Unraveled by New Specific Immunoassays ». *Neurobiology of Aging* 34 (2): 523-39. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.05.016>.
- Rapoport, Mark, Hana N. Dawson, Lester I. Binder, Michael P. Vitek, et Adriana Ferreira. 2002. « Tau Is Essential to  $\beta$ -Amyloid-Induced Neurotoxicity ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (9): 6364-69. <https://doi.org/10.1073/pnas.092136199>.
- Rebeck, G. W., J. S. Reiter, D. K. Strickland, et B. T. Hyman. 1993. « Apolipoprotein E in Sporadic Alzheimer's Disease: Allelic Variation and Receptor Interactions ». *Neuron* 11 (4): 575-80. [https://doi.org/10.1016/0896-6273\(93\)90070-8](https://doi.org/10.1016/0896-6273(93)90070-8).
- Rebeck, G. William, Robert D. Moir, Stina Mui, Dudley K. Strickland, Rudolph E. Tanzi, et Bradley T. Hyman. 2001. « Association of Membrane-Bound Amyloid Precursor Protein APP with the Apolipoprotein E Receptor LRP ». *Molecular Brain Research* 87 (2): 238-45. [https://doi.org/10.1016/S0169-328X\(01\)00006-7](https://doi.org/10.1016/S0169-328X(01)00006-7).
- Refolo, Lorenzo M., Miguel A. Pappolla, Brian Malester, John LaFrancois, Tara Bryant-Thomas, Rong Wang, G. Stephen Tint, Kumar Sambamurti, et Karen Duff. 2000. « Hypercholesterolemia Accelerates the Alzheimer's Amyloid Pathology in a Transgenic Mouse Model ». *Neurobiology of Disease* 7 (4): 321-31. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2000.0304>.
- Reiman, Eric M, Kewei Chen, Xiaofen Liu, Daniel Bandy, Meixiang Yu, Wendy Lee, Napatkamon Ayutyanont, et al. 2009. « Fibrillar Amyloid- $\beta$  Burden in Cognitively Normal People at 3 Levels of Genetic Risk for Alzheimer's Disease ».

- Reiman, Eric M, Yakeel T Quiroz, Adam S Fleisher, Kewei Chen, Carlos Velez-Pardo, Marlene Jimenez-Del-Rio, Anne M Fagan, et al. 2012. « Brain Imaging and Fluid Biomarker Analysis in Young Adults at Genetic Risk for Autosomal Dominant Alzheimer's Disease in the Presenilin 1 E280A Kindred: A Case-Control Study ». *The Lancet Neurology* 11 (12): 1048-56. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70228-4](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70228-4).
- Reinert, Jochim, Bernhard C. Richard, Hans W. Klafki, Beate Friedrich, Thomas A. Bayer, Jens Wiltfang, Gabor G. Kovacs, et al. 2016. « Deposition of C-Terminally Truncated A $\beta$  Species A $\beta$ 37 and A $\beta$ 39 in Alzheimer's Disease and Transgenic Mouse Models ». *Acta Neuropathologica Communications* 4 (1): 24. <https://doi.org/10.1186/s40478-016-0294-7>.
- Reiss, Allison B, et Iryna Voloshyna. 2013. « Regulation of Cerebral Cholesterol Metabolism in Alzheimer's Disease ».
- Reitz, Christiane, Carol Brayne, et Richard Mayeux. 2011. « Epidemiology of Alzheimer Disease ». *Nature Reviews Neurology* 7 (3): 137-52. <https://doi.org/10.1038/nrneurol.2011.2>.
- Ren, Zhao, Dale Schenk, Guriqbal S. Basi, et I. Paul Shapiro. 2007. « Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor Juxtamembrane Domain Regulates Specificity of  $\gamma$ -Secretase-Dependent Cleavages ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (48): 35350-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702739200>.
- Rezgaoui, Meriem, Guido Hermey, I BjoÈrn Riedel, Wolfgang Hampe, H Chica Schaller, et Irm Hermans-Borgmeyer. 2001. « Identi<sup>®</sup>cation of SorCS2, a Novel Member of the VPS10 Domain Containing Receptor Family, Prominently Expressed in the Developing Mouse Brain ». *Mechanisms of Development*.
- Ries, Miriam, et Magdalena Sastre. 2016. « Mechanisms of A $\beta$  Clearance and Degradation by Glial Cells ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 8 (juillet). <https://doi.org/10.3389/fnagi.2016.00160>.
- Ring, Sabine, Sascha W. Weyer, Susanne B. Kilian, Elaine Waldron, Claus U. Pietrzik, Mikhail A. Filippov, Jochen Herms, et al. 2007. « The Secreted  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Ectodomain APP $\alpha$  Is Sufficient to Rescue the Anatomical, Behavioral, and Electrophysiological Abnormalities of APP-Deficient Mice ». *The Journal of Neuroscience* 27 (29): 7817-26. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.1026-07.2007>.
- Ringheim, Garth E, Ann Marie Szczepanik, Wayne Petko, Kendra L Burgher, Sheng Zu Zhu, et Chun C Chao. 1998. « Enhancement of Beta-Amyloid Precursor Protein Transcription and Expression by the Soluble Interleukin-6 Receptor/interleukin-6 Complex ».
- Robakis, Nikolaos K., Henry K. M. Wisniewski, Edmund C. Jenkins, Evelyn A. Devine-Gage, George E. Houck, Xiu-Lan Yao, Narayanarao Ramakrishna, Gloria Wolfe, Wayne P. Silverman, et W. Ted Brown. 1987. « CHROMOSOME 21q21 SUBLOCALISATION OF GENE ENCODING BETA-AMYLOID PEPTIDE IN CEREBRAL VESSELS AND NEURITIC (SENILE) PLAQUES OF PEOPLE WITH ALZHEIMER DISEASE AND DOWN SYNDROME ». *The Lancet* 329 (8529): 384-85. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(87\)91754-5](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(87)91754-5).
- Roberson, Erik D., Kimberly Scarce-Lavie, Jorge J. Palop, Fengrong Yan, Irene H. Cheng, Tiffany Wu, Hilary Gerstein, Gui-Qiu Yu, et Lennart Mucke. 2007. « Reducing Endogenous Tau Ameliorates Amyloid Beta-Induced Deficits in an Alzheimer's Disease Mouse Model ». *Science (New York, N.Y.)* 316 (5825): 750-54. <https://doi.org/10.1126/science.1141736>.
- Robinson, Morgan, Brenda Y. Lee, et Francis T. Hane. 2017. « Recent Progress in Alzheimer's Disease Research, Part 2: Genetics and Epidemiology ». *Journal of Alzheimer's Disease* 57 (2): 317-30. <https://doi.org/10.3233/JAD-161149>.
- Rocha, Milagros, Antonio Hernandez-Mijares, Katherinne Garcia-Malpartida, Celia Bañuls, Lorena Bellod, et Victor M. Victor. 2010. « Mitochondria-Targeted Antioxidant Peptides ». *Current Pharmaceutical Design* 16 (28): 3124-31. <https://doi.org/10.2174/138161210793292519>.
- Rogaev, E. I., R. Sherrington, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, Y. Liang, H. Chi, C. Lin, K. Holman, et T. Tsuda. 1995. « Familial Alzheimer's Disease in Kindreds with Missense Mutations in a

- Gene on Chromosome 1 Related to the Alzheimer's Disease Type 3 Gene ». *Nature* 376 (6543): 775-78. <https://doi.org/10.1038/376775a0>.
- Rogaeva, Ekaterina, Yan Meng, Joseph H. Lee, Yongjun Gu, Toshitaka Kawarai, Fanggeng Zou, Taiichi Katayama, et al. 2007. « The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer's Disease ». *Nature genetics* 39 (2): 168-77. <https://doi.org/10.1038/ng1943>.
- Rogers, Joseph, Rena Li, Diego Mastroeni, Andrew Grover, Brian Leonard, Geoffrey Ahern, Phillip Cao, et al. 2006. « Peripheral Clearance of Amyloid  $\beta$  Peptide by Complement C3-Dependent Adherence to Erythrocytes ». *Neurobiology of Aging* 27 (12): 1733-39. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2005.09.043>.
- Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst, et C. P. Blobel. 1999. « Metalloprotease-Disintegrin MDC9: Intracellular Maturation and Catalytic Activity ». *The Journal of Biological Chemistry* 274 (6): 3531-40. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.6.3531>.
- Rooke, Karen, Chris Talbot, Louise James, Rakesh Anand, John A. Hardy, et Alison M. Goate. 1993. « A Physical Map of the Human APP Gene in YACs ». *Mammalian Genome* 4 (11): 662-69. <https://doi.org/10.1007/BF00360904>.
- Roses, Allen D. 2006. « On the Discovery of the Genetic Association of Apolipoprotein E Genotypes and Common Late-Onset Alzheimer Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease: JAD* 9 (3 Suppl): 361-66. <https://doi.org/10.3233/jad-2006-9s340>.
- Rovelet-Lecrux, Anne, Sebastien Feuillette, Laetitia Miguel, Catherine Schramm, Ségolène Pernet, Olivier Quenez, Isabelle Ségalas-Milazzo, et al. 2021. « Impaired SorLA Maturation and Trafficking as a New Mechanism for SORL1 Missense Variants in Alzheimer Disease ». *Acta Neuropathologica Communications* 9 (1): 196. <https://doi.org/10.1186/s40478-021-01294-4>.
- Rovelet-Lecrux, Anne, Didier Hannequin, Gregory Raux, Nathalie Le Meur, Annie Laquerrière, Anne Vital, Cécile Dumanchin, et al. 2006. « APP Locus Duplication Causes Autosomal Dominant Early-Onset Alzheimer Disease with Cerebral Amyloid Angiopathy ». *Nature Genetics* 38 (1): 24-26. <https://doi.org/10.1038/ng1718>.
- Royston, M. C., D. Mann, S. Pickering-Brown, F. Owen, R. Perry, R. Raghavan, C. Khin-Nu, S. Tyrer, K. Day, et R. Crook. 1994. « Apolipoprotein E Epsilon 2 Allele Promotes Longevity and Protects Patients with Down's Syndrome from Dementia ». *Neuroreport* 5 (18): 2583-85. <https://doi.org/10.1097/00001756-199412000-00044>.
- Rui, Yanfang, Jiaping Gu, Kuai Yu, H Criss Hartzell, et James Q Zheng. 2010. « Inhibition of AMPA Receptor Trafficking at Hippocampal Synapses by B-Amyloid Oligomers: The Mitochondrial Contribution ».
- Rushworth, Jo V., et Nigel M. Hooper. 2011. « Lipid Rafts: Linking Alzheimer's Amyloid-  $\beta$  Production, Aggregation, and Toxicity at Neuronal Membranes ». *International Journal of Alzheimer's Disease* 2011: 1-14. <https://doi.org/10.4061/2011/603052>.
- Sabo, Shasta L., Annat F. Ikin, Joseph D. Buxbaum, et Paul Greengard. 2003. « The Amyloid Precursor Protein and Its Regulatory Protein, FE65, in Growth Cones and Synapses *In Vitro* and *In Vivo* ». *The Journal of Neuroscience* 23 (13): 5407-15. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.23-13-05407.2003>.
- Sadik, Golam, Hiroyuki Kaji, Kazuya Takeda, Fumino Yamagata, Yosuke Kameoka, Katsuyuki Hashimoto, Kazuo Miyanaga, et Tomotaka Shinoda. 1999. « In vitro processing of amyloid precursor protein by cathepsin D ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 (11): 1327-37. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(99\)00053-9](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(99)00053-9).
- Saftig, Paul, Christoph Peters, Kurt von Figura, Katleen Craessaerts, Fred Van Leuven, et Bart De Strooper. 1996. « Amyloidogenic Processing of Human Amyloid Precursor Protein in



- Hippocampal Neurons Devoid of Cathepsin D \* ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (44): 27241-44. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.44.27241>.
- Sagare, A. P., R. D. Bell, et B. V. Zlokovic. 2012. « Neurovascular Dysfunction and Faulty Amyloid - Peptide Clearance in Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (10): a011452-a011452. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011452>.
- Sagare, Abhay P., Rashid Deane, Henrik Zetterberg, Anders Wallin, Kaj Blennow, et Berislav V. Zlokovic. 2011. « Impaired Lipoprotein Receptor-Mediated Peripheral Binding of Plasma Amyloid- $\beta$  Is an Early Biomarker for Mild Cognitive Impairment Preceding Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 24 (1): 25-34. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-101248>.
- Sager, Kristen L., Joanne Wu, Susan E. Leurgans, Howard D. Rees, Marla Gearing, Elliott J. Mufson, Allan I. Levey, et James J. Lah. 2007. « Neuronal LR11/sorLA Expression Is Reduced in Mild Cognitive Impairment ». *Annals of Neurology* 62 (6): 640-47. <https://doi.org/10.1002/ana.21190>.
- Saido, T. C., W. Yamao-Harigaya, T. Iwatsubo, et S. Kawashima. 1996. « Amino- and Carboxyl-Terminal Heterogeneity of Beta-Amyloid Peptides Deposited in Human Brain ». *Neuroscience Letters* 215 (3): 173-76. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(96\)12970-0](https://doi.org/10.1016/0304-3940(96)12970-0).
- Saido, T., et M. A. Leissring. 2012. « Proteolytic Degradation of Amyloid -Protein ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (6): a006379-a006379. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006379>.
- Saido, Takaomi C, Takeshi Iwatsubo, David M A Mann, Hiroyuki Shimada, Yasuo Ihara, et Seiichi Kawashima. 1995. « Dominant and Differential Deposition of Distinct I -Amyloid Peptide Species, A $\beta$ N3(pE), in Senile Plaques ».
- Sambamurti, Kumar, Nigel H. Greig, et Debomoy K. Lahiri. 2002. « Advances in the Cellular and Molecular Biology of the Beta-Amyloid Protein in Alzheimer's Disease ». *Neuromolecular Medicine* 1 (1): 1-31. <https://doi.org/10.1385/NMM:1:1:1>.
- Sancho, David, María C. Montoya, Alicia Monjas, Mónica Gordón-Alonso, Takuya Katagiri, Diana Gil, Reyes Tejedor, Balbino Alarcón, et Francisco Sánchez-Madrid. 2002. « TCR Engagement Induces Proline-Rich Tyrosine Kinase-2 (Pyk2) Translocation to the T Cell-APC Interface Independently of Pyk2 Activity and in an Immunoreceptor Tyrosine-Based Activation Motif-Mediated Fashion1 ». *The Journal of Immunology* 169 (1): 292-300. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.169.1.292>.
- Sannerud, Ragna, Cary Esselens, Paulina Ejsmont, Rafael Mattera, Leila Rochin, Arun Kumar Tharkeshwar, Greet De Baets, et al. 2016. « Restricted Location of PSEN2/ $\gamma$ -Secretase Determines Substrate Specificity and Generates an Intracellular A $\beta$  Pool ». *Cell* 166 (1): 193-208. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.020>.
- SantaCruz, K., J. Lewis, T. Spires, J. Paulson, L. Kotilinek, M. Ingelsson, A. Guimaraes, et al. 2005. « Tau Suppression in a Neurodegenerative Mouse Model Improves Memory Function ». *Science* 309 (5733): 476-81. <https://doi.org/10.1126/science.1113694>.
- Sato, Chihiro, Yuichi Morohashi, Taisuke Tomita, et Takeshi Iwatsubo. 2006. « Structure of the Catalytic Pore of  $\gamma$ -Secretase Probed by the Accessibility of Substituted Cysteines ». *The Journal of Neuroscience* 26 (46): 12081-88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3614-06.2006>.
- Sato, Shinji, Yoshitaka Tatebayashi, Takumi Akagi, De-Hua Chui, Miyuki Murayama, Tomohiro Miyasaka, Emmanuel Planel, et al. 2002. « Aberrant Tau Phosphorylation by Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  and JNK3 Induces Oligomeric Tau Fibrils in COS-7 Cells ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (44): 42060-65. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202241200>.
- Sato, Toru, Thekla S. Diehl, Saravanakumar Narayanan, Satoru Funamoto, Yasuo Ihara, Bart De Strooper, Harald Steiner, Christian Haass, et Michael S. Wolfe. 2007. « Active  $\gamma$ -Secretase

- Complexes Contain Only One of Each Component ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (47): 33985-93. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705248200>.
- Sato, Toru, Naoshi Dohmae, Yue Qi, Nobuto Kakuda, Hiroaki Misonou, Rie Mitsumori, Hiroko Maruyama, et al. 2003. « Potential Link between Amyloid  $\beta$ -Protein 42 and C-terminal Fragment  $\gamma$  49–99 of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein\* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (27): 24294-301. <https://doi.org/10.1074/jbc.M211161200>.
- Sato, Toru, Yu Tanimura, Naoko Hirotsu, Takaomi C. Saido, Maho Morishima-Kawashima, et Yasuo Ihara. 2005. « Blocking the Cleavage at Midportion between  $\gamma$ - and  $\epsilon$ -Sites Remarkably Suppresses the Generation of Amyloid  $\beta$ -Protein ». *FEBS Letters* 579 (13): 2907-12. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2005.04.037>.
- Savastano, Adriana, Hans Klafki, Ute Haußmann, Timo Jan Oberstein, Petr Muller, Oliver Wirths, Jens Wiltfang, et Thomas A. Bayer. 2016. « N-Truncated A $\beta$  2-X Starting with Position Two in Sporadic Alzheimer's Disease Cases and Two Alzheimer Mouse Models ». *Journal of Alzheimer's Disease* 49 (1): 101-10. <https://doi.org/10.3233/JAD-150394>.
- Savonenko, A. V., T. Melnikova, F. M. Laird, K.-A. Stewart, D. L. Price, et P. C. Wong. 2008. « Alteration of BACE1-dependent NRG1/ErbB4 signaling and schizophrenia-like phenotypes in BACE1-null mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (14): 5585-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.0710373105>.
- Scharfenberg, Franka, Fred Armbrust, Liana Marengo, Claus Pietrzik, et Christoph Becker-Pauly. 2019. « Regulation of the Alternative  $\beta$ -Secretase Meprin  $\beta$  by ADAM-Mediated Shedding ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 76 (16): 3193-3206. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03179-1>.
- Scheff, S. W., D. A. Price, F. A. Schmitt, S. T. DeKosky, et E. J. Mufson. 2007. « Synaptic Alterations in CA1 in Mild Alzheimer Disease and Mild Cognitive Impairment ». *Neurology* 68 (18): 1501-8. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000260698.46517.8f>.
- Scheff, Scheff W., et Douglas A. Price. 1993. « Synapse Loss in the Temporal Lobe in Alzheimer's Disease ». *Annals of Neurology* 33 (2): 190-99. <https://doi.org/10.1002/ana.410330209>.
- Scheff, Stephen W., Steven T. DeKosky, et Douglas A. Price. 1990. « Quantitative Assessment of Cortical Synaptic Density in Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 11 (1): 29-37. [https://doi.org/10.1016/0197-4580\(90\)90059-9](https://doi.org/10.1016/0197-4580(90)90059-9).
- Scheinfeld, Meir H., Enrico Ghersi, Karen Laky, B. J. Fowlkes, et Luciano D'Adamio. 2002. « Processing of  $\beta$ -Amyloid Precursor-like Protein-1 and -2 by  $\gamma$ -Secretase Regulates Transcription\* ». *Journal of Biological Chemistry* 277 (46): 44195-201. <https://doi.org/10.1074/jbc.M208110200>.
- Schellenberg, Gerard D., Thomas D. Bird, Ellen M. Wijsman, Harry T. Orr, Leojean Anderson, Ellen Nemens, June A. White, et al. 1992. « Genetic Linkage Evidence for a Familial Alzheimer's Disease Locus on Chromosome 14 ». *Science* 258 (5082): 668-71. <https://doi.org/10.1126/science.1411576>.
- Scherzer, Clemens R., Katrin Offe, Marla Gearing, Howard D. Rees, Guofu Fang, Craig J. Heilman, Chica Schaller, Hideaki Bujo, Allan I. Levey, et James J. Lah. 2004. « Loss of Apolipoprotein E Receptor LR11 in Alzheimer Disease ». *Archives of Neurology* 61 (8): 1200-1205. <https://doi.org/10.1001/archneur.61.8.1200>.
- Schilling, Stephan, Ulrike Zeitschel, Torsten Hoffmann, Ulrich Heiser, Mike Francke, Astrid Kehlen, Max Holzer, et al. 2008. « Glutaminyl Cyclase Inhibition Attenuates Pyroglutamate A $\beta$  and Alzheimer's Disease-like Pathology ». *Nature Medicine* 14 (10): 1106-11. <https://doi.org/10.1038/nm.1872>.
- Schlenzig, Dagmar, Holger Cynis, Maike Hartlage-Rübsamen, Ulrike Zeitschel, Katja Menge, Anja Fothe, Daniel Ramsbeck, et al. 2018. « Dipeptidyl-Peptidase Activity of Meprin  $\beta$  Links N-

- Truncation of A $\beta$  with Glutaminyl Cyclase-Catalyzed pGlu-A $\beta$  Formation ». *Journal of Alzheimer's Disease* 66 (1): 359-75. <https://doi.org/10.3233/JAD-171183>.
- Schlenzig, Dagmar, Susanne Manhart, Yeliz Cinar, Martin Kleinschmidt, Gerd Hause, Dieter Willbold, Susanne Aileen Funke, Stephan Schilling, et Hans-Ulrich Demuth. 2009. « Pyroglutamate Formation Influences Solubility and Amyloidogenicity of Amyloid Peptides ». Research-article. ACS Publications. American Chemical Society. World. 1 juillet 2009. <https://doi.org/10.1021/bi900818a>.
- Schmidt, Vanessa, Katharina Baum, Angelyn Lao, Katja Rateitschak, Yvonne Schmitz, Anke Teichmann, Burkhard Wiesner, et al. 2012. « Quantitative modelling of amyloidogenic processing and its influence by SORLA in Alzheimer's disease ». *The EMBO Journal* 31 (1): 187-200. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.352>.
- Schmidt, Vanessa, Anje Sporbert, Michael Rohe, Tatjana Reimer, Armin Rehm, Olav M. Andersen, et Thomas E. Willnow. 2007. « SorLA/LR11 Regulates Processing of Amyloid Precursor Protein via Interaction with Adaptors GGA and PACS-1\* ». *Journal of Biological Chemistry* 282 (45): 32956-64. <https://doi.org/10.1074/jbc.M705073200>.
- Schrijvers, Elisabeth M. C., Peter J. Koudstaal, Albert Hofman, et Monique M. B. Breteler. 2011. « Plasma Clusterin and the Risk of Alzheimer Disease ». *JAMA* 305 (13): 1322-26. <https://doi.org/10.1001/jama.2011.381>.
- Schröter, A., R. Mergl, K. Bürger, H. Hampel, H.-J. Möller, et U. Hegerl. 2003. « Kinematic Analysis of Handwriting Movements in Patients with Alzheimer's Disease, Mild Cognitive Impairment, Depression and Healthy Subjects ». *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 15 (3): 132-42. <https://doi.org/10.1159/000068484>.
- Schubert, Walter, Reinhard Prior, Andreas Weidemann, et Heinrich Dirksen. 1991. « Localization of Alzheimer flA4 Amyloid Precursor Protein at Central and Peripheral Synaptic Sites ».
- Seab, J. P., W. J. Jagust, S. T. S. Wong, M. S. Roos, B. R. Reed, et T. F. Budinger. 1988. « Quantitative NMR Measurements of Hippocampal Atrophy in Alzheimer's Disease ». *Magnetic Resonance in Medicine* 8 (2): 200-208. <https://doi.org/10.1002/mrm.1910080210>.
- Seabrook, Guy R., et Thomas W. Rosahl. 1999. « Transgenic Animals Relevant to Alzheimer's Disease ». *Neuropharmacology* 38 (1): 1-17. [https://doi.org/10.1016/S0028-3908\(98\)00170-1](https://doi.org/10.1016/S0028-3908(98)00170-1).
- Selkoe, Dennis J. 1991. « Amyloid Protein and Alzheimer's Disease ». *Scientific American* 265 (5): 68-79.
- . 1997. « Alzheimer's Disease--Genotypes, Phenotype, and Treatments ». *Science* 275 (5300): 630-31. <https://doi.org/10.1126/science.275.5300.630>.
- Selkoe, Dennis J. 2001. « Alzheimer's Disease Results from the Cerebral Accumulation and Cytotoxicity of Amyloid  $\beta$ -Protein ».
- Selkoe, Dennis J. 2002. « Deciphering the Genesis and Fate of Amyloid  $\beta$ -Protein Yields Novel Therapies for Alzheimer Disease ». *Journal of Clinical Investigation* 110 (10): 1375-81. <https://doi.org/10.1172/JCI0216783>.
- Selkoe, Dennis J, et John Hardy. 2016. « The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease at 25 Years ». *EMBO Molecular Medicine* 8 (6): 595-608. <https://doi.org/10.15252/emmm.201606210>.
- Selkoe, Dennis J, Marcia Berman Podlisny, Catharine L Joachim, Elizabeth A Vickers, Gloria Lee, LAWRENCE C FRITZt, et TILMAN OLTERSDFRt. 1988. « F3-Amyloid Precursor Protein of Alzheimer Disease Occurs as 110- to 135-Kilodalton Membrane-Associated Proteins in Neural and Nonneural Tissues ».
- Sepulveda, Fernando J., Jorge Parodi, Robert W. Peoples, Carlos Opazo, et Luis G. Aguayo. 2010. « Synaptotoxicity of Alzheimer Beta Amyloid Can Be Explained by Its Membrane Perforating Property ». Édité par Howard E. Gendelman. *PLoS ONE* 5 (7): e11820. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011820>.

- Serrano-Pozo, A., M. P. Frosch, E. Masliah, et B. T. Hyman. 2011. « Neuropathological Alterations in Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 1 (1): a006189-a006189. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006189>.
- Seshadri, S., P. A. Wolf, A. Beiser, R. Au, K. McNulty, R. White, et R. B. D'Agostino. 1997. « Lifetime Risk of Dementia and Alzheimer's Disease. The Impact of Mortality on Risk Estimates in the Framingham Study ». *Neurology* 49 (6): 1498-1504. <https://doi.org/10.1212/wnl.49.6.1498>.
- Seshadri, Sudha, et Philip A Wolf. 2007. « Lifetime Risk of Stroke and Dementia: Current Concepts, and Estimates from the Framingham Study ». *The Lancet Neurology* 6 (12): 1106-14. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(07\)70291-0](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(07)70291-0).
- Seubert, Peter, Tilman Oltersdorf, Michael G. Lee, Robin Barbour, Cheryl Blomquist, David L. Davis, Karin Bryant, et al. 1993. « Secretion of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Cleaved at the Amino Terminus of the  $\beta$ -Amyloid Peptide ». *Nature* 361 (6409): 260-63. <https://doi.org/10.1038/361260a0>.
- Sevalle, Jean, Audrey Amoyel, Philippe Robert, Marie-Claude Fournié-Zaluski, Bernard Roques, et Frédéric Checler. 2009. « Aminopeptidase A Contributes to the N-terminal Truncation of Amyloid B-peptide ». *Journal of Neurochemistry* 109 (1): 248-56. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.05950.x>.
- Shah, Sanjiv, Sheu-Fen Lee, Katsuhiko Tabuchi, Yi-Heng Hao, Cong Yu, Quincey LaPlant, Haydn Ball, Charles E. Dann, Thomas Südhof, et Gang Yu. 2005. « Nicastrin Functions as a  $\gamma$ -Secretase-Substrate Receptor ». *Cell* 122 (3): 435-47. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.05.022>.
- Shah, Sanjiv, et Gang Yu. 2006. « sorLA: Sorting out APP ». *Molecular Interventions* 6 (2): 74-76, 58. <https://doi.org/10.1124/mi.6.2.4>.
- Sharples, Robyn A., Laura J. Vella, Rebecca M. Nisbet, Ryan Naylor, Keyla Perez, Kevin J. Barnham, Colin L. Masters, et Andrew F. Hill. 2008. « Inhibition of  $\gamma$ -Secretase Causes Increased Secretion of Amyloid Precursor Protein C-Terminal Fragments in Association with Exosomes ». *The FASEB Journal* 22 (5): 1469-78. <https://doi.org/10.1096/fj.07-9357com>.
- Sherrington, R. 1996. « Alzheimer's Disease Associated with Mutations in Presenilin 2 Is Rare and Variably Penetrant ». *Human Molecular Genetics* 5 (7): 985-88. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.985>.
- Sherrington, R., E. I. Rogaev, Y. Liang, E. A. Rogaeva, G. Levesque, M. Ikeda, H. Chi, et al. 1995. « Cloning of a Gene Bearing Missense Mutations in Early-Onset Familial Alzheimer's Disease ». *Nature* 375 (6534): 754-60. <https://doi.org/10.1038/375754a0>.
- Shiple, Mackenzie M., Colleen A. Mangold, et Moriah L. Szpara. 2016. « Differentiation of the SH-SY5Y Human Neuroblastoma Cell Line ». *Journal of Visualized Experiments*, n° 108 (février): 53193. <https://doi.org/10.3791/53193>.
- Shirotani, Keiro, Dieter Edbauer, Anja Capell, Julia Schmitz, Harald Steiner, et Christian Haass. 2003. «  $\gamma$ -Secretase Activity Is Associated with a Conformational Change of Nicastrin \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (19): 16474-77. <https://doi.org/10.1074/jbc.C300095200>.
- Shirotani, Keiro, Dieter Edbauer, Stefan Prokop, Christian Haass, et Harald Steiner. 2004. « Identification of Distinct  $\gamma$ -Secretase Complexes with Different APH-1 Variants \* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (40): 41340-45. <https://doi.org/10.1074/jbc.M405768200>.
- Shulman, J. M., S. Imboywa, N. Giagtzoglou, M. P. Powers, Y. Hu, D. Devenport, P. Chipendo, et al. 2014. « Functional Screening in Drosophila Identifies Alzheimer's Disease Susceptibility Genes and Implicates Tau-Mediated Mechanisms ». *Human Molecular Genetics* 23 (4): 870-77. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt478>.
- Siemes, Christina, Thomas Quast, Christiane Kummer, Sven Wehner, Gregor Kirfel, Ulrike Müller, et Volker Herzog. 2006. « Keratinocytes from APP/APLP2-deficient mice are impaired in proliferation, adhesion and migration in vitro ». *Experimental Cell Research* 312 (11): 1939-49. <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2006.02.025>.

- Silva, Marcos Vinícius Ferreira, Cristina De Mello Gomide Loures, Luan Carlos Vieira Alves, Leonardo Cruz De Souza, Karina Braga Gomes Borges, et Maria Das Graças Carvalho. 2019. « Alzheimer's Disease: Risk Factors and Potentially Protective Measures ». *Journal of Biomedical Science* 26 (1): 33. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0524-y>.
- Sims, Rebecca, ARUK Consortium, GERAD/PERADES, CHARGE, ADGC, EADI, Sven J Van Der Lee, Adam C Naj, Céline Bellenguez, Nandini Badarinarayan, et al. 2017. « Rare Coding Variants in PLAG2, ABI3, and TREM2 Implicate Microglial-Mediated Innate Immunity in Alzheimer's Disease ». *Nature Genetics* 49 (9): 1373-84. <https://doi.org/10.1038/ng.3916>.
- Sinha, Sukanto, John P. Anderson, Robin Barbour, Guriqbal S. Basi, Russell Caccavello, David Davis, Minhtam Doan, et al. 1999. « Purification and Cloning of Amyloid Precursor Protein  $\beta$ -Secretase from Human Brain ». *Nature* 402 (6761): 537-40. <https://doi.org/10.1038/990114>.
- Skovronsky, Daniel M., Shannon Fath, Virginia M.-Y. Lee, et Marcos E. Milla. 2001. « Neuronal Localization of the TNF $\alpha$  Converting Enzyme (TACE) in Brain Tissue and Its Correlation to Amyloid Plaques ». *Journal of Neurobiology* 49 (1): 40-46. <https://doi.org/10.1002/neu.1064>.
- Skovronsky, Daniel M., D. Blaine Moore, Marcos E. Milla, Robert W. Doms, et Virginia M.-Y. Lee. 2000. « Protein Kinase C-Dependent  $\alpha$ -Secretase Competes with  $\beta$ -Secretase for Cleavage of Amyloid- $\beta$  Precursor Protein in the Trans-Golgi Network \* ». *Journal of Biological Chemistry* 275 (4): 2568-75. <https://doi.org/10.1074/jbc.275.4.2568>.
- Slack, Barbara E, Leona K Ma, et Ching Ching Seah. 2001. « Constitutive Shedding of the Amyloid Precursor Protein Ectodomain Is Up-Regulated by Tumour Necrosis Factor- $\alpha$  Converting Enzyme ».
- Small, D. H., H. L. Clarris, T. G. Williamson, G. Reed, B. Key, S. S. Mok, K. Beyreuther, C. L. Masters, et V. Nurcombe. 1999. « Neurite-Outgrowth Regulating Functions of the Amyloid Protein Precursor of Alzheimer's Disease ». *Journal of Alzheimer's Disease* 1 (4-5): 275-85. <https://doi.org/10.3233/JAD-1999-14-508>.
- Small, D. H., S. S. Mok, et J. C. Bornstein. 2001. « Alzheimer's Disease and Abeta Toxicity: From Top to Bottom ». *Nature Reviews. Neuroscience* 2 (8): 595-98. <https://doi.org/10.1038/35086072>.
- Small, Scott A. 2008. « Retromer Sorting: A Pathogenic Pathway in Late-Onset Alzheimer Disease ». *Archives of Neurology* 65 (3). <https://doi.org/10.1001/archneurol.2007.64>.
- Small, Scott A., et Sam Gandy. 2006. « Sorting through the Cell Biology of Alzheimer's Disease: Intracellular Pathways to Pathogenesis ». *Neuron* 52 (1): 15-31. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2006.09.001>.
- Small, Scott A., Kelly Kent, Aimee Pierce, Conrad Leung, Min Suk Kang, Hirokazu Okada, Lawrence Honig, Jean-Paul Vonsattel, et Tae-Wan Kim. 2005. « Model-Guided Microarray Implicates the Retromer Complex in Alzheimer's Disease ». *Annals of Neurology* 58 (6): 909-19. <https://doi.org/10.1002/ana.20667>.
- Smith, Joshua A., Arabinda Das, Swapan K. Ray, et Naren L. Banik. 2012. « Role of Pro-Inflammatory Cytokines Released from Microglia in Neurodegenerative Diseases ». *Brain Research Bulletin* 87 (1): 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2011.10.004>.
- Smith, Mark A, Catherine A Rottkamp, Akihiko Nunomura, Arun K Raina, et George Perry. 2000. « Oxidative Stress in Alzheimer's Disease ». *Biochimica et Biophysica Acta*.
- Snyder, Eric M., Yi Nong, Claudia G. Almeida, Surojit Paul, Timothy Moran, Eun Young Choi, Angus C. Nairn, et al. 2005. « Regulation of NMDA Receptor Trafficking by Amyloid-Beta ». *Nature Neuroscience* 8 (8): 1051-58. <https://doi.org/10.1038/nn1503>.
- Soba, Peter, Simone Eggert, Katja Wagner, Hanswalter Zentgraf, Katjuscha Siehl, Sylvia Kreger, Alexander Löwer, et al. 2005. « Homo- and Heterodimerization of APP Family Members Promotes Intercellular Adhesion ». *The EMBO Journal* 24 (20): 3624-34. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600824>.

- Solomon, Alina, Miia Kivipelto, Benjamin Wolozin, Jufen Zhou, et Rachel A. Whitmer. 2009. « Midlife Serum Cholesterol and Increased Risk of Alzheimer's and Vascular Dementia Three Decades Later ». *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders* 28 (1): 75-80.  
<https://doi.org/10.1159/000231980>.
- Sonkusare, S.K., C.L. Kaul, et P. Ramarao. 2005. « Dementia of Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Disorders—Memantine, a New Hope ». *Pharmacological Research* 51 (1): 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2004.05.005>.
- Sosa, Lucas J., Jared Bergman, Adriana Estrada-Bernal, Thomas J. Glorioso, John M. Kittelson, et Karl H. Pfenninger. 2013. « Amyloid Precursor Protein Is an Autonomous Growth Cone Adhesion Molecule Engaged in Contact Guidance ». Édité par Zhongcong Xie. *PLoS ONE* 8 (5): e64521.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0064521>.
- Sosa, Lucas J., Alfredo Cáceres, Sebastián Dupraz, Mariana Oksdath, Santiago Quiroga, et Alfredo Lorenzo. 2017. « The Physiological Role of the Amyloid Precursor Protein as an Adhesion Molecule in the Developing Nervous System ». *Journal of Neurochemistry* 143 (1): 11-29.  
<https://doi.org/10.1111/jnc.14122>.
- Soscia, Stephanie J., James E. Kirby, Kevin J. Washicosky, Stephanie M. Tucker, Martin Ingelsson, Bradley Hyman, Mark A. Burton, et al. 2010. « The Alzheimer's Disease-Associated Amyloid  $\beta$ -Protein Is an Antimicrobial Peptide ». Édité par Ashley I. Bush. *PLoS ONE* 5 (3): e9505.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0009505>.
- Sossey-Alaoui, Khalid, Elzbieta Pluskota, Dorota Szpak, et Edward F. Plow. 2019. « The Kindlin2-P53-SerpinB2 Signaling Axis Is Required for Cellular Senescence in Breast Cancer ». *Cell Death & Disease* 10 (8): 539. <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1774-z>.
- Sotiropoulos, Ioannis, Caterina Catania, Therese Riedemann, Jonathan P. Fry, Kieran C. Breen, Theologos M. Michaelidis, et Osborne F. X. Almeida. 2008. « Glucocorticoids Trigger Alzheimer Disease-like Pathobiochemistry in Rat Neuronal Cells Expressing Human Tau: Glucocorticoids, Human Tau and Alzheimer's Disease ». *Journal of Neurochemistry* 107 (2): 385-97. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2008.05613.x>.
- Sothejeau, Yoann, Alexis Bretteville, François-Xavier Cantrelle, Nicolas Malmanche, Florie Demiaute, Tiago Mendes, Charlotte Delay, et al. 2015. « Tau Phosphorylation Regulates the Interaction between BIN1's SH3 Domain and Tau's Proline-Rich Domain ». *Acta Neuropathologica Communications* 3 (1): 58. <https://doi.org/10.1186/s40478-015-0237-8>.
- Southam, Katherine A., Fiona Stennard, Cassandra Pavez, et David H. Small. 2019. « Knockout of Amyloid  $\beta$  Protein Precursor (APP) Expression Alters Synaptogenesis, Neurite Branching and Axonal Morphology of Hippocampal Neurons ». *Neurochemical Research* 44 (6): 1346-55.  
<https://doi.org/10.1007/s11064-018-2512-0>.
- Španić, Ena, Lea Langer Horvat, Patrick R. Hof, et Goran Šimić. 2019. « Role of Microglial Cells in Alzheimer's Disease Tau Propagation ». *Frontiers in Aging Neuroscience* 11.  
<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnagi.2019.00271>.
- Sparks, D. L., S. W. Scheff, J. C. Hunsaker, H. Liu, T. Landers, et D. R. Gross. 1994. « Induction of Alzheimer-like Beta-Amyloid Immunoreactivity in the Brains of Rabbits with Dietary Cholesterol ». *Experimental Neurology* 126 (1): 88-94.  
<https://doi.org/10.1006/exnr.1994.1044>.
- Spasic, Dragana, et Wim Annaert. 2008. « Building  $\gamma$ -Secretase – the Bits and Pieces ». *Journal of Cell Science* 121 (4): 413-20. <https://doi.org/10.1242/jcs.015255>.
- Spires-Jones, Tara L., William H. Stoothoff, Alix De Calignon, Phillip B. Jones, et Bradley T. Hyman. 2009. « Tau Pathophysiology in Neurodegeneration: A Tangled Issue ». *Trends in Neurosciences* 32 (3): 150-59. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2008.11.007>.
- Spoelgen, Robert, Christine A. F. Von Arnim, Anne V. Thomas, Ithan D. Peltan, Mirjam Koker, Amy Deng, Michael C. Irizarry, Olav M. Andersen, Thomas E. Willnow, et Bradley T. Hyman. 2006.

- « Interaction of the Cytosolic Domains of sorLA/LR11 with the Amyloid Precursor Protein (APP) and  $\beta$ -Secretase  $\beta$ -Site APP-Cleaving Enzyme ». *The Journal of Neuroscience* 26 (2): 418-28. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3882-05.2006>.
- Stahl, Ronny, Sandra Schilling, Peter Soba, Carsten Rupp, Tobias Hartmann, Katja Wagner, Gunter Merdes, Simone Eggert, et Stefan Kins. 2014. « Shedding of APP Limits Its Synaptogenic Activity and Cell Adhesion Properties ». *Frontiers in Cellular Neuroscience* 8: 410. <https://doi.org/10.3389/fncel.2014.00410>.
- Stefaniak, Ewelina, et Wojciech Bal. 2019. « Cu<sup>II</sup> Binding Properties of N-Truncated A $\beta$  Peptides: In Search of Biological Function ». *Inorganic Chemistry* 58 (20): 13561-77. <https://doi.org/10.1021/acs.inorgchem.9b01399>.
- Steiner, Harald, et Christian Haass. 2000. « Intramembrane Proteolysis by Presenilins ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 1 (3): 217-24. <https://doi.org/10.1038/35043065>.
- Stelzmann, Rainulf A., H. Norman Schnitzlein, et F. Reed Murtagh. 1995. « An English Translation of Alzheimer's 1907 Paper, ?ber Eine Eigenartige Erkrankung Der Hirnrinde? ». *Clinical Anatomy* 8 (6): 429-31. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>.
- Stratman, Nancy C., Christine K. Castle, Bruce M. Taylor, Dennis E. Epps, George W. Melchior, et Donald B. Carter. 2005. « Isoform-specific interactions of human apolipoprotein E to an intermediate conformation of human Alzheimer amyloid-beta peptide ». *Chemistry and Physics of Lipids* 137 (1): 52-61. <https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2005.06.005>.
- Strittmatter, W J, A M Saunders, M Goedert, K H Weisgraber, L M Dong, R Jakes, D Y Huang, M Pericak-Vance, D Schmechel, et A D Roses. 1994. « Isoform-Specific Interactions of Apolipoprotein E with Microtubule-Associated Protein Tau: Implications for Alzheimer Disease. ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 91 (23): 11183-86. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.23.11183>.
- Strittmatter, Warren J, Jan Enghild, GuY S Salvesen, et Allen D Roses. 1993. « Apolipoprotein E: High-Avidity Binding to  $\beta$ -Amyloid and Increased Frequency of Type 4 Allele in Late-Onset Familial Alzheimer Disease ». *Proc. Natl Acad. Sci. USA*.
- Strozyk, D., K. Blennow, L. R. White, et L. J. Launer. 2003. « CSF A $\beta$ 42 Levels Correlate with Amyloid-Neuropathology in a Population-Based Autopsy Study ». *Neurology* 60 (4): 652-56. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000046581.81650.d0>.
- Suire, Caitlin N., Samer O. Abdul-Hay, Tomoko Sahara, Dongcheul Kang, Monica K. Brizuela, Paul Saftig, Dennis W. Dickson, Terrone L. Rosenberry, et Malcolm A. Leissring. 2020. « Cathepsin D regulates cerebral A $\beta$ 42/40 ratios via differential degradation of A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40 ». *Alzheimer's Research & Therapy* 12 (1): 80. <https://doi.org/10.1186/s13195-020-00649-8>.
- Sullivan, Christopher P., Anthony G. Jay, Edward C. Stack, Maria Pakaluk, Erin Wadlinger, Richard E. Fine, John M. Wells, et Peter J. Morin. 2011. « Retromer Disruption Promotes Amyloidogenic APP Processing ». *Neurobiology of Disease* 43 (2): 338-45. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2011.04.002>.
- Sun, C. K., K. Man, K. T. Ng, J. W. Ho, Z. X. Lim, Q. Cheng, C.-M. Lo, R. T. Poon, et S.-T. Fan. 2008. « Proline-Rich Tyrosine Kinase 2 (Pyk2) Promotes Proliferation and Invasiveness of Hepatocellular Carcinoma Cells through c-Src/ERK Activation ». *Carcinogenesis* 29 (11): 2096-2105. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgn203>.
- Sun, Xiaojuan, Wei-Dong Chen, et Yan-Dong Wang. 2015. «  $\beta$ -Amyloid: The Key Peptide in the Pathogenesis of Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Pharmacology* 6: 221. <https://doi.org/10.3389/fphar.2015.00221>.
- Sun, Yayi, Nerina R. Sommerville, Julia Yuen Hang Liu, Man Piu Ngan, Daniel Poon, Eugene D. Ponomarev, Zengbing Lu, Jeng S. C. Kung, et John A. Rudd. 2020. « Intra-gastrointestinal amyloid- $\beta$ 1-42 oligomers perturb enteric function and induce Alzheimer's disease pathology ». *The Journal of Physiology* 598 (19): 4209-23. <https://doi.org/10.1113/JP279919>.



- Suzuki, Kuninori, Yuka Kubota, Takayuki Sekito, et Yoshinori Ohsumi. 2007. « Hierarchy of Atg Proteins in Pre-Autophagosomal Structure Organization ». *Genes to Cells* 12 (2): 209-18. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2007.01050.x>.
- Suzuki, Nobuhiro, Tobun T. Cheung, Xiao-Dan Cai, Asano Odaka, Laszlo Otvos, Christopher Eckman, Todd E. Golde, et Steven G. Younkin. 1994. « An Increased Percentage of Long Amyloid  $\beta$  Protein Secreted by Familial Amyloid  $\beta$  Protein Precursor ( $\beta$ App717) Mutants ». *Science* 264 (5163): 1336-40. <https://doi.org/10.1126/science.8191290>.
- Suzuki, Toshiharu, et Tadashi Nakaya. 2008. « Regulation of Amyloid  $\beta$ -Protein Precursor by Phosphorylation and Protein Interactions ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (44): 29633-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800003200>.
- Takahashi, Muneaki, Haruka Miyata, Fuyuki Kametani, Takashi Nonaka, Haruhiko Akiyama, Shin-ichi Hisanaga, et Masato Hasegawa. 2015. « Extracellular Association of APP and Tau Fibrils Induces Intracellular Aggregate Formation of Tau ». *Acta Neuropathologica* 129 (6): 895-907. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1415-2>.
- Takami, Mako, Yu Nagashima, Yoshihisa Sano, Seiko Ishihara, Maho Morishima-Kawashima, Satoru Funamoto, et Yasuo Ihara. 2009. «  $\gamma$ -Secretase: Successive Tripeptide and Tetrapeptide Release from the Transmembrane Domain of  $\beta$ -Carboxyl Terminal Fragment ». *The Journal of Neuroscience* 29 (41): 13042-52. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2362-09.2009>.
- Takashima, Akihiko, Haruyasu Yamaguchi, Kaori Noguchi, Gilles Michel, Koichi Ishiguro, Kazuki Sato, Toshimitu Hoshino, Minako Hoshi, et Kazutomo Imahori. 1995. « Amyloid  $\beta$  peptide induces cytoplasmic accumulation of amyloid protein precursor via tau protein kinase I/glycogen synthase kinase-3 $\beta$  in rat hippocampal neurons ». *Neuroscience Letters* 198 (2): 83-86. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(95\)11964-X](https://doi.org/10.1016/0304-3940(95)11964-X).
- Takasugi, Nobumasa, Taisuke Tomita, Ikuo Hayashi, Makiko Tsuruoka, Manabu Niimura, Yasuko Takahashi, Gopal Thinakaran, et Takeshi Iwatsubo. 2003. « The Role of Presenilin Cofactors in the G-Secretase Complex » 422.
- Takeda, K., W. Araki, H. Akiyama, et T. Tabira. 2004. « PRIME PubMed | Amino-Truncated Amyloid Beta-Peptide (A $\beta$ 5-40/42) Produced from Caspase-Cleaved Amyloid Precursor Protein Is Deposited in Alzheimer's Disease Brain ». 2004. [https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/15364896/Amino\\_truncated\\_amyloid\\_beta\\_peptide\\_\\_Abeta5\\_40/42\\_\\_produced\\_from\\_caspase\\_cleaved\\_amyloid\\_precursor\\_protein\\_is\\_deposited\\_in\\_Alzheimer's\\_disease\\_brain\\_](https://www.unboundmedicine.com/medline/citation/15364896/Amino_truncated_amyloid_beta_peptide__Abeta5_40/42__produced_from_caspase_cleaved_amyloid_precursor_protein_is_deposited_in_Alzheimer's_disease_brain_).
- Takeo, Koji, Shun Tanimura, Takehiro Shinoda, Satoko Osawa, Ivan Krasmirov Zahariev, Naoki Takegami, Yoshiko Ishizuka-Katsura, et al. 2014. « Allosteric Regulation of  $\gamma$ -Secretase Activity by a Phenylimidazole-Type  $\gamma$ -Secretase Modulator ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111 (29): 10544-49. <https://doi.org/10.1073/pnas.1402171111>.
- Tamayev, Robert, Dawang Zhou, et Luciano D'Adamio. 2009. « The Interactome of the Amyloid  $\beta$  Precursor Protein Family Members Is Shaped by Phosphorylation of Their Intracellular Domains ». *Molecular Neurodegeneration* 4 (1): 28. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-4-28>.
- Tan, Jing Zhi A., et Paul A. Gleeson. 2019. « The Role of Membrane Trafficking in the Processing of Amyloid Precursor Protein and Production of Amyloid Peptides in Alzheimer's Disease ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1861 (4): 697-712. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.11.013>.
- Tan, Meng-Shan, Jin-Tai Yu, et Lan Tan. 2013. « Bridging Integrator 1 (BIN1): Form, Function, and Alzheimer's Disease ». *Trends in Molecular Medicine* 19 (10): 594-603. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2013.06.004>.
- Tanabe, Chiaki, Nika Hotoda, Noboru Sasagawa, Atsuko Sehara-Fujisawa, Kei Maruyama, et Shoichi Ishiura. 2007. « ADAM19 Is Tightly Associated with Constitutive Alzheimer's Disease APP  $\alpha$ -

- Secretase in A172 Cells ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 352 (1): 111-17. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.181>.
- Tanaka, S., S. Shiojiri, Y. Takahashi, N. Kitaguchi, H. Ito, M. Kameyama, J. Kimura, S. Nakamura, et K. Ueda. 1989. « Tissue-Specific Expression of Three Types of Beta-Protein Precursor mRNA: Enhancement of Protease Inhibitor-Harboring Types in Alzheimer's Disease Brain ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 165 (3): 1406-14. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(89\)92760-5](https://doi.org/10.1016/0006-291x(89)92760-5).
- Tanaka, Seigo, Shigenobu Nakamura, Kunihiro Ueda, Masakuni Kameyama, Satoshi Shiojiri, Yasuyuki Takahashi, Nobuya Kitaguchi, et Hirataka Ito. 1988. « Three types of amyloid protein precursor mRNA in human brain: Their differential expression in Alzheimer's disease ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 157 (2): 472-79. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(88\)80273-0](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(88)80273-0).
- Tang, Bor Luen. 2009. « Neuronal Protein Trafficking Associated with Alzheimer Disease: From APP and BACE1 to Glutamate Receptors ». *Cell Adhesion & Migration* 3 (1): 118-28. <https://doi.org/10.4161/cam.3.1.7254>.
- Tanzi, R. E. 2012. « The Genetics of Alzheimer Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (10): a006296-a006296. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006296>.
- Tanzi, R. E., R. D. Moir, et S. L. Wagner. 2004. « Clearance of Alzheimer's A $\beta$  Peptide: The Many Roads to Perdition ». *Neuron* 43 (5): 605-8. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2004.08.024>.
- Tanzi, Rudolph E., James F. Gusella, Paul C. Watkins, Gail A. P. Bruns, Peter St George-Hyslop, Margaret L. Van Keuren, David Patterson, Susan Pagan, David M. Kurnit, et Rachael L. Neve. 1987. « Amyloid  $\beta$  Protein Gene: cDNA, mRNA Distribution, and Genetic Linkage Near the Alzheimer Locus ». *Science* 235 (4791): 880-84. <https://doi.org/10.1126/science.2949367>.
- Tao, Qing-Qing, Yan Chen, Zhi-Jun Liu, Yi-Min Sun, Ping Yang, Shen-Ji Lu, Miao Xu, Qin-Yun Dong, Jia-Jun Yang, et Zhi-Ying Wu. 2014. « Associations between Apolipoprotein E Genotypes and Serum Levels of Glucose, Cholesterol, and Triglycerides in a Cognitively Normal Aging Han Chinese Population ». *Clinical Interventions in Aging* 9: 1063-67. <https://doi.org/10.2147/CIA.S62554>.
- Tapiola, Tero, Irina Alafuzoff, Sanna-Kaisa Herukka, Laura Parkkinen, Päivi Hartikainen, Hilikka Soininen, et Tuula Pirttilä. 2009. « Cerebrospinal Fluid {beta}-Amyloid 42 and Tau Proteins as Biomarkers of Alzheimer-Type Pathologic Changes in the Brain ». *Archives of Neurology* 66 (3): 382-89. <https://doi.org/10.1001/archneurol.2008.596>.
- Tayeb, Haythum O., Hyun Duk Yang, Bruce H. Price, et Frank I. Tarazi. 2012. « Pharmacotherapies for Alzheimer's Disease: Beyond Cholinesterase Inhibitors ». *Pharmacology & Therapeutics* 134 (1): 8-25. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.12.002>.
- Taylor, Chanel J., David R. Ireland, Irene Ballagh, Katie Bourne, Nicola M. Marechal, Paul R. Turner, David K. Bilkey, Warren P. Tate, et Wickliffe C. Abraham. 2008. « Endogenous Secreted Amyloid Precursor Protein- $\alpha$  Regulates Hippocampal NMDA Receptor Function, Long-Term Potentiation and Spatial Memory ». *Neurobiology of Disease* 31 (2): 250-60. <https://doi.org/10.1016/j.nbd.2008.04.011>.
- Tebar, Francisc, Stefan K. Bohlander, et Alexander Sorkin. 1999. « Clathrin Assembly Lymphoid Myeloid Leukemia (CALM) Protein: Localization in Endocytic-Coated Pits, Interactions with Clathrin, and the Impact of Overexpression on Clathrin-Mediated Traffic ». Édité par Juan Bonifacino. *Molecular Biology of the Cell* 10 (8): 2687-2702. <https://doi.org/10.1091/mbc.10.8.2687>.
- Terry, Robert D., Eliezer Masliah, David P. Salmon, Nelson Butters, Richard DeTeresa, Robert Hill, Lawrence A. Hansen, et Robert Katzman. 1991. « Physical Basis of Cognitive Alterations in Alzheimer's Disease: Synapse Loss Is the Major Correlate of Cognitive Impairment ». *Annals of Neurology* 30 (4): 572-80. <https://doi.org/10.1002/ana.410300410>.

- Tesco, Giuseppina, Andrea Ginestroni, Mikko Hiltunen, Minji Kim, Georgia Dolios, Bradley T. Hyman, Rong Wang, Oksana Berezovska, et Rudolph E. Tanzi. 2005. « APP Substitutions V715F and L720P Alter PS1 Conformation and Differentially Affect A $\beta$  and AICD Generation ». *Journal of Neurochemistry* 95 (2): 446-56. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2005.03381.x>.
- Thal, D. R., I. Sassin, C. Schultz, C. Haass, E. Braak, et H. Braak. 1999. « Fleecy Amyloid Deposits in the Internal Layers of the Human Entorhinal Cortex Are Comprised of N-Terminal Truncated Fragments of Abeta ». *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 58 (2): 210-16. <https://doi.org/10.1097/00005072-199902000-00010>.
- Thambisetty, Madhav, Andrew Simmons, Latha Velayudhan, Abdul Hye, James Campbell, Yi Zhang, Lars-Olof Wahlund, et al. 2010. « Association of Plasma Clusterin Concentration With Severity, Pathology, and Progression in Alzheimer Disease ». *Archives of General Psychiatry* 67 (7): 739. <https://doi.org/10.1001/archgenpsychiatry.2010.78>.
- Theuns, J. 2000. « Genetic Variability in the Regulatory Region of Presenilin 1 Associated with Risk for Alzheimer's Disease and Variable Expression ». *Human Molecular Genetics* 9 (3): 325-31. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.3.325>.
- Theuns, Jessie, Nathalie Brouwers, Sebastiaan Engelborghs, Kristel Slegers, Veerle Bogaerts, Ellen Corsmit, Tim De Pooter, Cornelia M. Van Duijn, Peter P. De Deyn, et Christine Van Broeckhoven. 2006. « Promoter Mutations That Increase Amyloid Precursor-Protein Expression Are Associated with Alzheimer Disease ». *The American Journal of Human Genetics* 78 (6): 936-46. <https://doi.org/10.1086/504044>.
- Thinakaran, Gopal, David R Borchelt, Michael K Lee, Hilda H Slunt, Lia Spitzer, Grace Kim, Tamara Ratovitsky, et al. 1996. « Endoproteolysis of Presenilin 1 and Accumulation of Processed Derivatives In Vivo ». *Neuron* 17 (1): 181-90. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80291-3](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80291-3).
- Thinakaran, Gopal, et Edward H. Koo. 2008. « Amyloid Precursor Protein Trafficking, Processing, and Function ». *Journal of Biological Chemistry* 283 (44): 29615-19. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800019200>.
- Thomas, Jewell B., Matthew R. Brier, Randall J. Bateman, Abraham Z. Snyder, Tammie L. Benzinger, Chengjie Xiong, Marcus Raichle, et al. 2014. « Functional Connectivity in Autosomal Dominant and Late-Onset Alzheimer Disease ». *JAMA Neurology* 71 (9): 1111. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2014.1654>.
- Thomas, T., G. Thomas, C. McLendon, T. Sutton, et M. Mullan. 1996. « Beta-Amyloid-Mediated Vasoactivity and Vascular Endothelial Damage ». *Nature* 380 (6570): 168-71. <https://doi.org/10.1038/380168a0>.
- Thonberg, Håkan, Marie Fallström, Jenny Björkström, Jacqueline Schoumans, Inger Nennesmo, et Caroline Graff. 2011. « Mutation Screening of Patients with Alzheimer Disease Identifies APP Locus Duplication in a Swedish Patient ». *BMC Research Notes* 4 (1): 476. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-476>.
- Tienari, Pentti J, Nobuo Ida, Elina Ikonen, Mikael Simons, Andreas Weidemann, Gerd Multhaup, Colin L Masters, Carlos G Dotti, et Konrad Beyreuther. 1997. « Intracellular and Secreted Alzheimer  $\beta$ -Amyloid Species Are Generated by Distinct Mechanisms in Cultured Hippocampal Neurons ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Tiraboschi, P., L. A. Hansen, E. Masliah, M. Alford, L. J. Thal, et J. Corey-Bloom. 2004. « Impact of APOE Genotype on Neuropathologic and Neurochemical Markers of Alzheimer Disease ». *Neurology* 62 (11): 1977-83. <https://doi.org/10.1212/01.WNL.0000128091.92139.0F>.
- Tolia, Alexandra, Lucía Chávez-Gutiérrez, et Bart De Strooper. 2006. « Contribution of Presenilin Transmembrane Domains 6 and 7 to a Water-Containing Cavity in the  $\gamma$ -Secretase Complex \* ». *Journal of Biological Chemistry* 281 (37): 27633-42. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604997200>.

- Tolia, Alexandra, et Bart De Strooper. 2009. « Structure and Function of  $\gamma$ -Secretase ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 20 (2): 211-18. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2008.10.007>.
- Tolppanen, Anna-Maija, Tiia Ngandu, Ingemar Kåreholt, Tiina Laatikainen, Minna Rusanen, Hilikka Soininen, et Miia Kivipelto. 2014. « Midlife and Late-Life Body Mass Index and Late-Life Dementia: Results from a Prospective Population-Based Cohort ». *Journal of Alzheimer's Disease* 38 (1): 201-9. <https://doi.org/10.3233/JAD-130698>.
- Tomiyama, Takami, Shogo Matsuyama, Hiroyuki Iso, Tomohiro Umeda, Hiroshi Takuma, Kiyohisa Ohnishi, Kenichi Ishibashi, et al. 2010. « A Mouse Model of Amyloid  $\beta$  Oligomers: Their Contribution to Synaptic Alteration, Abnormal Tau Phosphorylation, Glial Activation, and Neuronal Loss *In Vivo* ». *The Journal of Neuroscience* 30 (14): 4845-56. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5825-09.2010>.
- Tosto, Giuseppe, Hongjun Fu, Badri N. Vardarajan, Joseph H. Lee, Rong Cheng, Dolly Reyes-Dumeyer, Rafael Lantigua, et al. 2015. « F-Box/LRR-Repeat Protein 7 Is Genetically Associated with Alzheimer's Disease ». *Annals of Clinical and Translational Neurology* 2 (8): 810-20. <https://doi.org/10.1002/acn3.223>.
- Tousseyn, Thomas, Amantha Thathiah, Ellen Jorissen, Tim Raemaekers, Uwe Konietzko, Karina Reiss, Elke Maes, et al. 2009. « ADAM10, the Rate-Limiting Protease of Regulated Intramembrane Proteolysis of Notch and Other Proteins, Is Processed by ADAMS-9, ADAMS-15, and the  $\gamma$ -Secretase ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (17): 11738-47. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805894200>.
- Traynor, Bryan J., et Andrew B. Singleton. 2010. « Nature versus Nurture: Death of a Dogma, and the Road Ahead ». *Neuron* 68 (2): 196-200. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2010.10.002>.
- Turk, Boris, Dušan Turk, et Vito Turk. 2000. « Lysosomal cysteine proteases: more than scavengers ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1477 (1): 98-111. [https://doi.org/10.1016/S0167-4838\(99\)00263-0](https://doi.org/10.1016/S0167-4838(99)00263-0).
- Turner, Paul R, Kate O'Connor, Warren P Tate, et Wickliffe C Abraham. 2003. « Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory ». *Progress in Neurobiology* 70 (1): 1-32. [https://doi.org/10.1016/S0301-0082\(03\)00089-3](https://doi.org/10.1016/S0301-0082(03)00089-3).
- Tyan, Sheue-Houy, Ann Yu-Jung Shih, Jessica J. Walsh, Hiroko Maruyama, Floyd Sarsoza, Lawrence Ku, Simone Eggert, Patrick R. Hof, Edward H. Koo, et Dara L. Dickstein. 2012. « Amyloid Precursor Protein (APP) Regulates Synaptic Structure and Function ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 51 (1-2): 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2012.07.009>.
- Tyler, Susan J, David Dawbarn, Gordon K Wilcock, et Shelley J Allen. 2002. «  $\alpha$ - and  $\beta$ -secretase: profound changes in Alzheimer's disease ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 299 (3): 373-76. [https://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02635-9](https://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02635-9).
- Ubelmann, Florent, Tatiana Burrinha, Laura Salavessa, Ricardo Gomes, Cláudio Ferreira, Nuno Moreno, et Cláudia Guimas Almeida. 2017. « Bin1 and CD 2 AP Polarise the Endocytic Generation of Beta-amyloid ». *EMBO Reports* 18 (1): 102-22. <https://doi.org/10.15252/embr.201642738>.
- Ullah, Mohammad Fahad, Aamir Ahmad, Showket Hussain Bhat, Faisal M. Abu-Duhier, George E. Barreto, et Ghulam Md Ashraf. 2019. « Impact of sex differences and gender specificity on behavioral characteristics and pathophysiology of neurodegenerative disorders ». *Neuroscience & Biobehavioral Reviews* 102 (juillet): 95-105. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2019.04.003>.
- Vaillant-Beuchot, Loan, Arnaud Mary, Raphaëlle Pardossi-Piquard, Alexandre Bourgeois, Inger Lauritzen, Fanny Eysert, Paula Fernanda Kinoshita, et al. 2021. « 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* 141 (1): 39-65. <https://doi.org/10.1007/s00401-020-02234-7>.

- Valverde, Audrey, Julie Dunys, Thomas Lorivel, Delphine Debayle, Anne-Sophie Gay, Céline Caillava, Mounia Chami, et Frédéric Checler. 2021. « Dipeptidyl peptidase 4 contributes to Alzheimer's disease-like defects in a mouse model and is increased in sporadic Alzheimer's disease brains ». *Journal of Biological Chemistry* 297 (2): 100963. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100963>.
- Van Cauwenberghe, Caroline, Christine Van Broeckhoven, et Kristel Sleegers. 2016. « The Genetic Landscape of Alzheimer Disease: Clinical Implications and Perspectives ». *Genetics in Medicine* 18 (5): 421-30. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.117>.
- Van Der Jeugd, Ann, Katja Hochgräfe, Tariq Ahmed, Jochen M. Decker, Astrid Sydow, Anne Hofmann, Dan Wu, et al. 2012. « Cognitive Defects Are Reversible in Inducible Mice Expressing Pro-Aggregant Full-Length Human Tau ». *Acta Neuropathologica* 123 (6): 787-805. <https://doi.org/10.1007/s00401-012-0987-3>.
- Vandenabeele, Peter, et Walter Fiers. 1991. « Is Amyloidogenesis during Alzheimer's Disease Due to an IL-1-/IL-6-Mediated 'Acute Phase Response' in the Brain? ». *Immunology Today* 12 (7): 217-19. [https://doi.org/10.1016/0167-5699\(91\)90032-O](https://doi.org/10.1016/0167-5699(91)90032-O).
- Vardarajan, Badri N., Yalun Zhang, Joseph H. Lee, Rong Cheng, Christopher Bohm, Mahdi Ghani, Christiane Reitz, et al. 2015. « Coding Mutations in *SORL1* and Alzheimer Disease: *SORL1* Variants and AD ». *Annals of Neurology* 77 (2): 215-27. <https://doi.org/10.1002/ana.24305>.
- Vassar, Robert, Brian D. Bennett, Safura Babu-Khan, Steve Kahn, Elizabeth A. Mendiaz, Paul Denis, David B. Teplow, et al. 1999. «  $\beta$ -Secretase Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein by the Transmembrane Aspartic Protease BACE ». *Science* 286 (5440): 735-41. <https://doi.org/10.1126/science.286.5440.735>.
- Veerhuis, Robert, Henrietta M. Nielsen, et Andrea J. Tenner. 2011. « Complement in the Brain ». *Molecular Immunology* 48 (14): 1592-1603. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2011.04.003>.
- Vehmas, Anne K, Claudia H Kawas, Walter F Stewart, et Juan C Troncoso. 2003. « Immune Reactive Cells in Senile Plaques and Cognitive Decline in Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 24 (2): 321-31. [https://doi.org/10.1016/S0197-4580\(02\)00090-8](https://doi.org/10.1016/S0197-4580(02)00090-8).
- Verbeek, Marcel M., Irene Otte-Höller, Jack A.M. Fransen, et Robert M.W. De Waal. 2002. « Accumulation of the Amyloid- $\beta$  Precursor Protein in Multivesicular Body-like Organelles ». *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 50 (5): 681-90. <https://doi.org/10.1177/002215540205000509>.
- Vergheze, Philip B., Joseph M. Castellano, Kanchan Garai, Yinong Wang, Hong Jiang, Aarti Shah, Guojun Bu, Carl Frieden, et David M. Holtzman. 2013. « ApoE Influences Amyloid- $\beta$  (A $\beta$ ) Clearance despite Minimal apoE/A $\beta$  Association in Physiological Conditions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (19). <https://doi.org/10.1073/pnas.1220484110>.
- Verheijen, Jan, Tobi Van Den Bossche, Julie Van Der Zee, Sebastiaan Engelborghs, Raquel Sanchez-Valle, Albert Lladó, Caroline Graff, et al. 2016. « A Comprehensive Study of the Genetic Impact of Rare Variants in *SORL1* in European Early-Onset Alzheimer's Disease ». *Acta Neuropathologica* 132 (2): 213-24. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1566-9>.
- Vetrivel, Kulandaivelu S, Yun-wu Zhang, Huaxi Xu, et Gopal Thinakaran. 2006. « Pathological and Physiological Functions of Presenilins ». *Molecular Neurodegeneration* 1 (1): 4. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-1-4>.
- Vieira, Sandra I., Sandra Rebelo, Hermann Esselmann, Jens Wiltfang, James Lah, Rachel Lane, Scott A. Small, Sam Gandy, Edgar F. da Cruz e Silva, et Odete AB da Cruz e Silva. 2010. « Retrieval of the Alzheimer's amyloid precursor protein from the endosome to the TGN is S655 phosphorylation state-dependent and retromer-mediated ». *Molecular Neurodegeneration* 5 (1): 40. <https://doi.org/10.1186/1750-1326-5-40>.
- Villemagne, Victor L., Suzuka Ataka, Toshiki Mizuno, William S. Brooks, Yasuhiro Wada, Masaki Kondo, Gareth Jones, et al. 2009. « High Striatal Amyloid  $\beta$ -Peptide Deposition Across

- Different Autosomal Alzheimer Disease Mutation Types ». *Archives of Neurology* 66 (12): 1537-44. <https://doi.org/10.1001/archneuro.2009.285>.
- Vingtdeux, Valérie, et Philippe Marambaud. 2012. « Identification and Biology of A-secretase ». *Journal of Neurochemistry* 120 (s1): 34-45. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2011.07477.x>.
- Vogiatzi, Tereza, Maria Xilouri, Kostas Vekrellis, et Leonidas Stefanis. 2008. « Wild Type  $\alpha$ -Synuclein Is Degraded by Chaperone-mediated Autophagy and Macroautophagy in Neuronal Cells ». *The Journal of Biological Chemistry* 283 (35): 23542-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M801992200>.
- Von Rotz, Ruth C., Bernhard M. Kohli, Jérôme Bosset, Michelle Meier, Toshiharu Suzuki, Roger M. Nitsch, et Uwe Konietzko. 2004. « The APP Intracellular Domain Forms Nuclear Multiprotein Complexes and Regulates the Transcription of Its Own Precursor ». *Journal of Cell Science* 117 (19): 4435-48. <https://doi.org/10.1242/jcs.01323>.
- Wagner, Jannek M., Marius E. Sichler, Eva M. Schleicher, Timon N. Franke, Caroline Irwin, Maximilian Johannes Löw, Nicola Beindorff, Caroline Bouter, Thomas A. Bayer, et Yvonne Bouter. 2019. « Analysis of Motor Function in the Tg4-42 Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Frontiers in Behavioral Neuroscience* 13 (mai): 107. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2019.00107>.
- Wahrle, Suzanne, Pritam Das, Andrew C. Nyborg, Chris McLendon, Mikio Shoji, Takeshi Kawarabayashi, Linda H. Younkin, Steven G. Younkin, et Todd E. Golde. 2002. « Cholesterol-Dependent  $\gamma$ -Secretase Activity in Buoyant Cholesterol-Rich Membrane Microdomains ». *Neurobiology of Disease* 9 (1): 11-23. <https://doi.org/10.1006/nbdi.2001.0470>.
- Wainberg, Michael, Tain Luquez, David M. Koelle, Ben Readhead, Christine Johnston, Martin Darvas, et Cory C. Funk. 2021. « The Viral Hypothesis: How Herpesviruses May Contribute to Alzheimer's Disease ». *Molecular Psychiatry* 26 (10): 5476-80. <https://doi.org/10.1038/s41380-021-01138-6>.
- Walker, Emily S., Maribel Martinez, Anne L. Brunkan, et Alison Goate. 2005. « Presenilin 2 Familial Alzheimer's Disease Mutations Result in Partial Loss of Function and Dramatic Changes in A $\beta$  42/40 Ratios ». *Journal of Neurochemistry* 92 (2): 294-301. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02858.x>.
- Walkiewicz, Katarzyna W., Jean-Antoine Girault, et Stefan T. Arold. 2015. « How to awaken your nanomachines: Site-specific activation of focal adhesion kinases through ligand interactions ». *Progress in Biophysics and Molecular Biology, Protein-Protein Interaction Analysis and Modulation*, 119 (1): 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.pbiomolbio.2015.06.001>.
- Walsh, Dominic M., Igor Klyubin, Julia V. Fadeeva, William K. Cullen, Roger Anwyl, Michael S. Wolfe, Michael J. Rowan, et Dennis J. Selkoe. 2002. « Naturally Secreted Oligomers of Amyloid  $\beta$  Protein Potently Inhibit Hippocampal Long-Term Potentiation in Vivo ». *Nature* 416 (6880): 535-39. <https://doi.org/10.1038/416535a>.
- Walsh, Dominic M., Bertrand P. Tseng, Russell E. Rydel, Marcia B. Podlisny, et Dennis J. Selkoe. 2000. « The Oligomerization of Amyloid  $\beta$ -Protein Begins Intracellularly in Cells Derived from Human Brain ». *Biochemistry* 39 (35): 10831-39. <https://doi.org/10.1021/bi001048s>.
- Wang, Chun-Yan, Tao Wang, Wei Zheng, Bao-Lu Zhao, Gorm Danscher, Yu-Hua Chen, et Zhan-You Wang. 2010. « Zinc Overload Enhances APP Cleavage and A $\beta$  Deposition in the Alzheimer Mouse Brain ». Édité par Ashley I. Bush. *PLoS ONE* 5 (12): e15349. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015349>.
- Wang, R., J. F. Meschia, R. J. Cotter, et S. S. Sisodia. 1991. « Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. » *Journal of Biological Chemistry* 266 (25): 16960-64. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)55397-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)55397-7).

- Wang, Yiling, et Lei Xue. 2014. « Mapping It out: A Novel Signaling Pathway Linking A $\beta$ -PrP<sup>&C</sup>-Fyn Complex to Cognitive Impairment in Alzheimer's Disease ». *Advances in Alzheimer's Disease* 03 (01): 20-23. <https://doi.org/10.4236/aad.2014.31003>.
- Wang, Yipeng, Marta Martinez-Vicente, Ulrike Krüger, Susmita Kaushik, Esther Wong, Eva-Maria Mandelkow, Ana Maria Cuervo, et Eckhard Mandelkow. 2009. « Tau Fragmentation, Aggregation and Clearance: The Dual Role of Lysosomal Processing ». *Human Molecular Genetics* 18 (21): 4153-70. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddp367>.
- Wang, Yong, Yun Shi, et Huafeng Wei. 2017. « Calcium Dysregulation in Alzheimer's Disease: A Target for New Drug Development ». *Journal of Alzheimer's Disease & Parkinsonism* 7 (5). <https://doi.org/10.4172/2161-0460.1000374>.
- Wang, Zilai, Baiping Wang, Li Yang, Qinxu Guo, Nadia Aithmitti, Zhou Songyang, et Hui Zheng. 2009. « Presynaptic and Postsynaptic Interaction of the Amyloid Precursor Protein Promotes Peripheral and Central Synaptogenesis ». *The Journal of Neuroscience* 29 (35): 10788-801. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2132-09.2009>.
- Watanabe, Tomomichi, Yukiko Hikichi, Antje Willuweit, Yasushi Shintani, et Takashi Horiguchi. 2012. « FBL2 Regulates Amyloid Precursor Protein (APP) Metabolism by Promoting Ubiquitination-Dependent APP Degradation and Inhibition of APP Endocytosis ». *The Journal of Neuroscience* 32 (10): 3352-65. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.5659-11.2012>.
- Weggen, Sascha, Jason L. Eriksen, Pritam Das, Sarah A. Sagi, Rong Wang, Claus U. Pietrzik, Kirk A. Findlay, et al. 2001. « A Subset of NSAIDs Lower Amyloidogenic A $\beta$ 42 Independently of Cyclooxygenase Activity ». *Nature* 414 (6860): 212-16. <https://doi.org/10.1038/35102591>.
- Weggen, Sascha, Jason L. Eriksen, Sarah A. Sagi, Claus U. Pietrzik, Victor Ozols, Abdul Fauq, Todd E. Golde, et Edward H. Koo. 2003. « Evidence That Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs Decrease Amyloid B42 Production by Direct Modulation of  $\gamma$ -Secretase Activity \* ». *Journal of Biological Chemistry* 278 (34): 31831-37. <https://doi.org/10.1074/jbc.M303592200>.
- Weidemann, A., G. König, D. Bunke, P. Fischer, J. M. Salbaum, C. L. Masters, et K. Beyreuther. 1989. « Identification, Biogenesis, and Localization of Precursors of Alzheimer's Disease A4 Amyloid Protein ». *Cell* 57 (1): 115-26. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(89\)90177-3](https://doi.org/10.1016/0092-8674(89)90177-3).
- Weidemann, Andreas, Simone Eggert, Friedrich B. M. Reinhard, Markus Vogel, Krzysztof Paliga, Gottfried Baier, Colin L. Masters, Konrad Beyreuther, et Geneviève Evin. 2002. « A Novel  $\epsilon$ -Cleavage within the Transmembrane Domain of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein Demonstrates Homology with Notch Processing ». *Biochemistry* 41 (8): 2825-35. <https://doi.org/10.1021/bi015794o>.
- Weidemann, Andreas, Krzysztof Paliga, Ulrike Dürrwang, Friedrich B. M. Reinhard, Oliver Schuckert, Geneviève Evin, et Colin L. Masters. 1999. « Proteolytic Processing of the Alzheimer's Disease Amyloid Precursor Protein within Its Cytoplasmic Domain by Caspase-like Proteases \* ». *Journal of Biological Chemistry* 274 (9): 5823-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.9.5823>.
- Weisgraber, Karl H., et Robert W. Mahley. 1996. « Human Apolipoprotein E: The Alzheimer's Disease Connection ». *The FASEB Journal* 10 (13): 1485-94. <https://doi.org/10.1096/fasebj.10.13.8940294>.
- Weisz, Ora A. 2003. « Acidification and Protein Traffic ». *International Review of Cytology* 226: 259-319. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(03\)01005-2](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(03)01005-2).
- Wertkin, Andrew M, R SCOTT TURNER, Samuel J Pleasure, TODD E GOLDE, STEVEN G YOUNKIN, et John Q Trojanowski. 1993. « Human Neurons Derived from a Teratocarcinoma Cell Line Express Solely the 695-Amino Acid Amyloid Precursor Protein and Produce Intracellular (8-Amyloid or A4 Peptides ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Westergaard, Uffe B., Esben S. Sørensen, Guido Hermey, Morten S. Nielsen, Anders Nykjær, Kirstine Kirkegaard, Christian Jacobsen, Jørgen Gliemann, Peder Madsen, et Claus Munck Petersen.



2004. « Functional Organization of the Sortilin Vps10p Domain\* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (48): 50221-29. <https://doi.org/10.1074/jbc.M408873200>.
- Westmeyer, Gil G., Michael Willem, Stefan F. Lichtenthaler, Glenn Lurman, Gerd Multhaup, Irmgard Assfalg-Machleidt, Karina Reiss, Paul Saftig, et Christian Haass. 2004. « Dimerization of  $\beta$ -Site  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein-cleaving Enzyme\* ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (51): 53205-12. <https://doi.org/10.1074/jbc.M410378200>.
- Weuve, Jennifer, Eric J. Tchetgen Tchetgen, M. Maria Glymour, Todd L. Beck, Neelum T. Aggarwal, Robert S. Wilson, Denis A. Evans, et Carlos F. Mendes de Leon. 2012. « Accounting for bias due to selective attrition: The example of smoking and cognitive decline ». *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 23 (1): 119-28. <https://doi.org/10.1097/EDE.0b013e318230e861>.
- Whitmer, R. A., D. R. Gustafson, E. Barrett-Connor, M. N. Haan, E. P. Gunderson, et K. Yaffe. 2008. « Central Obesity and Increased Risk of Dementia More than Three Decades Later ». *Neurology* 71 (14): 1057-64. <https://doi.org/10.1212/01.wnl.0000306313.89165.ef>.
- Willem, Michael, Sabina Tahirovic, Marc Aurel Busche, Saak V. Ovsepian, Magda Chafai, Scherazad Kootar, Daniel Hornburg, et al. 2015. «  $\eta$ -Secretase Processing of APP Inhibits Neuronal Activity in the Hippocampus ». *Nature* 526 (7573): 443-47. <https://doi.org/10.1038/nature14864>.
- Willnow, Thomas E., et Olav M. Andersen. 2013. « Sorting receptor SORLA – a trafficking path to avoid Alzheimer disease ». *Journal of Cell Science* 126 (13): 2751-60. <https://doi.org/10.1242/jcs.125393>.
- Willnow, Thomas E., Anne-Sophie Carlo, Michael Rohe, et Vanessa Schmidt. 2010. « SORLA/SORL1, a Neuronal Sorting Receptor Implicated in Alzheimer's Disease ». *Reviews in the Neurosciences* 21 (4): 315-29. <https://doi.org/10.1515/revneuro.2010.21.4.315>.
- Willnow, Thomas E., Claus M. Petersen, et Anders Nykjaer. 2008. « VPS10P-Domain Receptors — Regulators of Neuronal Viability and Function ». *Nature Reviews Neuroscience* 9 (12): 899-909. <https://doi.org/10.1038/nrn2516>.
- Wilson, Christina A., Robert W. Doms, Hui Zheng, et Virginia M.-Y. Lee. 2002. « Presenilins Are Not Required for A $\beta$ 42 Production in the Early Secretory Pathway ». *Nature Neuroscience* 5 (9): 849-55. <https://doi.org/10.1038/nn898>.
- Wilson, Robert S., Carlos F. Mendes de Leon, Lisa L. Barnes, Julie A. Schneider, Julia L. Bienias, Denis A. Evans, et David A. Bennett. 2002. « Participation in Cognitively Stimulating Activities and Risk of Incident Alzheimer Disease ». *JAMA* 287 (6): 742-48. <https://doi.org/10.1001/jama.287.6.742>.
- Wiltfang, J., H. Esselmann, M. Bibl, A. Smirnov, M. Otto, S. Paul, B. Schmidt, et al. 2002. « Highly Conserved and Disease-Specific Patterns of Carboxyterminally Truncated A $\beta$  Peptides 1–37/38/39 in Addition to 1–40/42 in Alzheimer's Disease and in Patients with Chronic Neuroinflammation ». *Journal of Neurochemistry* 81 (3): 481-96. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2002.00818.x>.
- Winblad, Bengt, Amouyel, Philippe, Andrieu, Sandrine, et Laura Fratiglioni. 2016. « Lancet Neurology Commission Paper ».
- Wirhth, Oliver, Tobias Bethge, Andrea Marcello, Anja Harmeier, Sadim Jawhar, Paul J. Lucassen, Gerd Multhaup, et al. 2010. « Pyroglutamate Abeta Pathology in APP/PS1KI Mice, Sporadic and Familial Alzheimer's Disease Cases ». *Journal of Neural Transmission* 117 (1): 85-96. <https://doi.org/10.1007/s00702-009-0314-x>.
- Wirhth, Oliver, Henning Breyhan, Holger Cynis, Stephan Schilling, Hans-Ulrich Demuth, et Thomas A. Bayer. 2009. « Intraneuronal Pyroglutamate-Abeta 3–42 Triggers Neurodegeneration and Lethal Neurological Deficits in a Transgenic Mouse Model ». *Acta Neuropathologica* 118 (4): 487-96. <https://doi.org/10.1007/s00401-009-0557-5>.

- Wirths, Oliver, Christian Erck, Henrik Martens, Anja Harmeier, Constanze Geumann, Sadim Jawhar, Sathish Kumar, et al. 2010. « Identification of Low Molecular Weight Pyroglutamate A $\beta$  Oligomers in Alzheimer Disease ». *Journal of Biological Chemistry* 285 (53): 41517-24. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.178707>.
- Wirths, Oliver, Gerd Multhaup, et Thomas A. Bayer. 2004. « A Modified Beta-Amyloid Hypothesis: Intraneuronal Accumulation of the Beta-Amyloid Peptide - the First Step of a Fatal Cascade ». *Journal of Neurochemistry* 91 (3): 513-20. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2004.02737.x>.
- Wirths, Oliver, Susanne Walter, Inga Kraus, Hans W. Klafki, Martina Stazi, Timo J. Oberstein, Jorge Ghiso, Jens Wiltfang, Thomas A. Bayer, et Sascha Weggen. 2017. « N-Truncated A $\beta$ 4-x Peptides in Sporadic Alzheimer's Disease Cases and Transgenic Alzheimer Mouse Models ». *Alzheimer's Research & Therapy* 9 (1): 80. <https://doi.org/10.1186/s13195-017-0309-z>.
- Wisniewski, Thomas, et Blas Frangione. 1992. « Apolipoprotein E: A Pathological Chaperone Protein in Patients with Cerebral and Systemic Amyloid ». *Neuroscience Letters* 135 (2): 235-38. [https://doi.org/10.1016/0304-3940\(92\)90444-C](https://doi.org/10.1016/0304-3940(92)90444-C).
- Wolf, Andrew B., Richard J. Caselli, Eric M. Reiman, et Jon Valla. 2013. « APOE and Neuroenergetics: An Emerging Paradigm in Alzheimer's Disease ». *Neurobiology of Aging* 34 (4): 1007-17. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2012.10.011>.
- Wolfe, Michael S. 2020. « Substrate Recognition and Processing by  $\gamma$ -Secretase ». *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* 1862 (1): 183016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.07.004>.
- Wolfe, Michael S., Weiming Xia, Beth L. Ostaszewski, Thekla S. Diehl, W. Taylor Kimberly, et Dennis J. Selkoe. 1999. « Two Transmembrane Aspartates in Presenilin-1 Required for Presenilin Endoproteolysis and  $\gamma$ -Secretase Activity ». *Nature* 398 (6727): 513-17. <https://doi.org/10.1038/19077>.
- Wong, Eitan, George P. Liao, Jerry C. Chang, Peng Xu, Yue-Ming Li, et Paul Greengard. 2019. « GSAP Modulates  $\gamma$ -Secretase Specificity by Inducing Conformational Change in PS1 ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (13): 6385-90. <https://doi.org/10.1073/pnas.1820160116>.
- Woodruff, Grace, Sol M. Reyna, Mariah Dunlap, Rik Van Der Kant, Julia A. Callender, Jessica E. Young, Elizabeth A. Roberts, et Lawrence S.B. Goldstein. 2016. « Defective Transcytosis of APP and Lipoproteins in Human iPSC-Derived Neurons with Familial Alzheimer's Disease Mutations ». *Cell Reports* 17 (3): 759-73. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2016.09.034>.
- Wu, David T., Ye Won Cho, Matthew D. Spalti, Mark Bishara, et Thomas T. Nguyen. 2023. « The link between periodontitis and Alzheimer's disease – emerging clinical evidence ». *Dentistry Review* 3 (1): 100062. <https://doi.org/10.1016/j.dentre.2022.100062>.
- Wu, Jinfang, Md. Riyaz Basha, Brian Brock, David P. Cox, Fernando Cardozo-Pelaez, Christopher A. McPherson, Jean Harry, et al. 2008. « Alzheimer's Disease (AD)-Like Pathology in Aged Monkeys after Infantile Exposure to Environmental Metal Lead (Pb): Evidence for a Developmental Origin and Environmental Link for AD ». *The Journal of Neuroscience* 28 (1): 3-9. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.4405-07.2008>.
- Wu, Liyong, Pedro Rosa-Neto, Ging-Yuek R. Hsiung, A. Dessa Sadovnick, Mario Masellis, Sandra E. Black, Jianping Jia, et Serge Gauthier. 2012. « Early-Onset Familial Alzheimer's Disease (EOFAD) ». *Canadian Journal of Neurological Sciences / Journal Canadien Des Sciences Neurologiques* 39 (4): 436-45. <https://doi.org/10.1017/S0317167100013949>.
- Wu, Zhourui, Zhi-Hao Wang, Xia Liu, Zhentao Zhang, Xiaohuan Gu, Shan Ping Yu, C. Dirk Keene, Liming Cheng, et Keqiang Ye. 2020. « Traumatic brain injury triggers APP and Tau cleavage by delta-secretase, mediating Alzheimer's disease pathology ». *Progress in Neurobiology* 185 (février): 101730. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2019.101730>.

- Wyss-Coray, T., et J. Rogers. 2012. « Inflammation in Alzheimer Disease--A Brief Review of the Basic Science and Clinical Literature ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (1): a006346-a006346. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006346>.
- Wyss-Coray, Tony, Fengrong Yan, Amy Hsiu-Ti Lin, John D. Lambris, Jessy J. Alexander, Richard J. Quigg, et Eliezer Masliah. 2002. « Prominent Neurodegeneration and Increased Plaque Formation in Complement-Inhibited Alzheimer's Mice ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99 (16): 10837-42. <https://doi.org/10.1073/pnas.162350199>.
- Xiao, Qingli, So-Chon Gil, Ping Yan, Yan Wang, Sharon Han, Ernie Gonzales, Ronaldo Perez, John R. Cirrito, et Jin-Moo Lee. 2012. « Role of Phosphatidylinositol Clathrin Assembly Lymphoid-Myeloid Leukemia (PICALM) in Intracellular Amyloid Precursor Protein (APP) Processing and Amyloid Plaque Pathogenesis ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (25): 21279-89. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.338376>.
- Xu, Jian, Manavi Chatterjee, Tyler D. Baguley, Jonathan Brouillette, Pradeep Kurup, Debolina Ghosh, Jean Kanyo, et al. 2014. « Inhibitor of the Tyrosine Phosphatase STEP Reverses Cognitive Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». Édité par Chaitan Khosla. *PLoS Biology* 12 (8): e1001923. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001923>.
- Xu, Jian, Pradeep Kurup, Jason A. Bartos, Tommaso Patriarchi, Johannes W. Hell, et Paul J. Lombroso. 2012. « Striatal-Enriched Protein-Tyrosine Phosphatase (STEP) Regulates Pyk2 Kinase Activity ». *Journal of Biological Chemistry* 287 (25): 20942-56. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.368654>.
- Xu, Y., H.-S. Kim, Y. Joo, Y. Choi, K.-A. Chang, C. H. Park, K.-Y. Shin, et al. 2007. « Intracellular Domains of Amyloid Precursor-like Protein 2 Interact with CP2 Transcription Factor in the Nucleus and Induce Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  Expression ». *Cell Death & Differentiation* 14 (1): 79-91. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401928>.
- Yagishita, Sosuke, Eugene Futai, et Shoichi Ishiura. 2008. « In vitro reconstitution of  $\gamma$ -secretase activity using yeast microsomes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 377 (1): 141-45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2008.09.090>.
- Yagishita, Sousuke, Maho Morishima-Kawashima, Yu Tanimura, Shoichi Ishiura, et Yasuo Ihara. 2006. « DAPT-Induced Intracellular Accumulations of Longer Amyloid  $\beta$ -Proteins: Further Implications for the Mechanism of Intramembrane Cleavage by  $\gamma$ -Secretase ». *Biochemistry* 45 (12): 3952-60. <https://doi.org/10.1021/bi0521846>.
- Yamazaki, Hiroyuki, Hideaki Bujo, Jun Kusunoki, Kouichi Seimiya, Tatsuro Kanaki, Nobuhiro Morisaki, Wolfgang Johann Schneider, et Yasushi Saito. 1996. « Elements of Neural Adhesion Molecules and a Yeast Vacuolar Protein Sorting Receptor Are Present in a Novel Mammalian Low Density Lipoprotein Receptor Family Member ». *Journal of Biological Chemistry* 271 (40): 24761-68. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.40.24761>.
- Yamazaki, Tsuneo, Dennis J Selkoe, et Edward H Koo. 1995. « Trafficking of Cell Surface/ $\beta$ -Amyloid Precursor Protein: Retrograde and Transcytotic Transport in Cultured Neurons ».
- Yan, Riqiang, Michael J. Bienkowski, Mary E. Shuck, Huiyi Miao, Monica C. Tory, Adele M. Pauley, John R. Brashler, et al. 1999. « Membrane-Anchored Aspartyl Protease with Alzheimer's Disease  $\beta$ -Secretase Activity ». *Nature* 402 (6761): 533-37. <https://doi.org/10.1038/990107>.
- Yang, Li-Bang, Kristina Lindholm, Riqiang Yan, Martin Citron, Weiming Xia, Xiao-Li Yang, Thomas Beach, et al. 2003. « Elevated  $\beta$ -Secretase Expression and Enzymatic Activity Detected in Sporadic Alzheimer Disease ». *Nature Medicine* 9 (1): 3-4. <https://doi.org/10.1038/nm0103-3>.
- Yankner, Bruce A., Lawrence K. Duffy, et Daniel A. Kirschner. 1990. « Neurotrophic and Neurotoxic Effects of Amyloid  $\beta$  Protein: Reversal by Tachykinin Neuropeptides | Science ». 1990. [https://www.science.org/doi/10.1126/science.2218531?url\\_ver=Z39.88-2003&rfr\\_id=ori:rid:crossref.org&rfr\\_dat=cr\\_pub%20%20pubmed](https://www.science.org/doi/10.1126/science.2218531?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori:rid:crossref.org&rfr_dat=cr_pub%20%20pubmed).

- Yarchoan, M., S. X. Xie, M. A. Kling, J. B. Toledo, D. A. Wolk, E. B. Lee, V. Van Deerlin, V. M.- Y. Lee, J. Q. Trojanowski, et S. E. Arnold. 2012. « Cerebrovascular Atherosclerosis Correlates with Alzheimer Pathology in Neurodegenerative Dementias ». *Brain* 135 (12): 3749-56. <https://doi.org/10.1093/brain/aws271>.
- Yen, Wei-Lien, Takahiro Shintani, Usha Nair, Yang Cao, Brian C. Richardson, Zhijian Li, Frederick M. Hughson, Misuzu Baba, et Daniel J. Klionsky. 2010. « The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy ». *The Journal of Cell Biology* 188 (1): 101-14. <https://doi.org/10.1083/jcb.200904075>.
- Yoshikai, S., H. Sasaki, K. Doh-ura, H. Furuya, et Y. Sakaki. 1990. « Genomic Organization of the Human Amyloid Beta-Protein Precursor Gene ». *Gene* 87 (2): 257-63. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(90\)90310-n](https://doi.org/10.1016/0378-1119(90)90310-n).
- Yoshimoto, Makoto, AKIHIKO IWAIt, David Kang, Deborah A C Otero, Yu Xia, et TSUNAO SAITOht. 1995. « NACP, the Precursor Protein of the Non-Amyloid 18/A4 Protein (A18) Component of Alzheimer Disease Amyloid, Binds Af8 and Stimulates Af3 Aggregation ». *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.
- Youssef, Ihsen, Sabrina Florent-Béchar, Catherine Malaplate-Armand, Violette Koziel, Bernard Bihain, Jean-Luc Olivier, Brigitte Leininger-Muller, Badreddine Kriem, Thierry Oster, et Thierry Pillot. 2008. « N-Truncated Amyloid- $\beta$  Oligomers Induce Learning Impairment and Neuronal Apoptosis ». *Neurobiology of Aging* 29 (9): 1319-33. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2007.03.005>.
- Yu, Chunjiang, Seong-Hun Kim, Takeshi Ikeuchi, Huaxi Xu, Laura Gasparini, Rong Wang, et Sangram S. Sisodia. 2001. « Characterization of a Presenilin-Mediated Amyloid Precursor Protein Carboxyl-Terminal Fragment  $\gamma$  ». *Journal of Biological Chemistry* 276 (47): 43756-60. <https://doi.org/10.1074/jbc.C100410200>.
- Yu, Gang, Masaki Nishimura, Shigeki Arawaka, Diane Levitan, Lili Zhang, Anurag Tandon, You-Qiang Song, et al. 2000. « Nicastrin Modulates Presenilin-Mediated Notch/Glp-1 Signal Transduction and  $\beta$ APP Processing ». *Nature* 407 (6800): 48-54. <https://doi.org/10.1038/35024009>.
- Yun, Sang-Moon, Sun-Jung Cho, Chulman Jo, Moon Ho Park, Changsu Han, et Young Ho Koh. 2020. « Elevation of plasma soluble amyloid precursor protein beta in Alzheimer's disease ». *Archives of Gerontology and Geriatrics* 87 (mars): 103995. <https://doi.org/10.1016/j.archger.2019.103995>.
- Zhang, Yan, Richard McLaughlin, Cynthia Goodyer, et Andréa LeBlanc. 2002. « Selective Cytotoxicity of Intracellular Amyloid  $\beta$  Peptide1-42 through P53 and Bax in Cultured Primary Human Neurons ». *The Journal of Cell Biology* 156 (3): 519-29. <https://doi.org/10.1083/jcb.200110119>.
- Zhang, Yun-wu, Robert Thompson, Han Zhang, et Huaxi Xu. 2011. « APP Processing in Alzheimer's Disease ». *Molecular Brain* 4 (1): 3. <https://doi.org/10.1186/1756-6606-4-3>.
- Zhang, Yun-wu, Ruishan Wang, Qiang Liu, Han Zhang, Francesca-Fang Liao, et Huaxi Xu. 2007. « Presenilin/ $\gamma$ -secretase-dependent processing of  $\beta$ -amyloid precursor protein regulates EGF receptor expression ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104 (25): 10613-18. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703903104>.
- Zhang, Zhentao, Mingke Song, Xia Liu, Seong Su Kang, Duc M. Duong, Nicholas T. Seyfried, Xuebing Cao, et al. 2015. « Delta-Secretase Cleaves Amyloid Precursor Protein and Regulates the Pathogenesis in Alzheimer's Disease ». *Nature Communications* 6 (1): 8762. <https://doi.org/10.1038/ncomms9762>.
- Zhang, Zhentao, Manling Xie, et Keqiang Ye. 2016. « Asparagine endopeptidase is an innovative therapeutic target for neurodegenerative diseases ». *Expert opinion on therapeutic targets* 20 (10): 1237-45. <https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1182990>.

- Zheng, Lin, Katarina Kågedal, Nodi Dehvari, Eirikur Benedikz, Richard Cowburn, Jan Marcusson, et Alexei Terman. 2009. « Oxidative Stress Induces Macroautophagy of Amyloid  $\beta$ -Protein and Ensuing Apoptosis ». *Free Radical Biology and Medicine* 46 (3): 422-29. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2008.10.043>.
- Zheng, W.-H., S. Bastianetto, F. Mennicken, W. Ma, et S. Kar. 2002. « Amyloid Beta Peptide Induces Tau Phosphorylation and Loss of Cholinergic Neurons in Rat Primary Septal Cultures ». *Neuroscience* 115 (1): 201-11. [https://doi.org/10.1016/s0306-4522\(02\)00404-9](https://doi.org/10.1016/s0306-4522(02)00404-9).
- Zhi, Pei, Cheryl Chia, et Paul A. Gleeson. 2011. « Intracellular Trafficking of the  $\beta$ -Secretase and Processing of Amyloid Precursor Protein ». *IUBMB Life*, n/a-n/a. <https://doi.org/10.1002/iub.512>.
- Zhong, Ning, et Karl H. Weisgraber. 2009. « Understanding the Association of Apolipoprotein E4 with Alzheimer Disease: Clues from Its Structure ». *Journal of Biological Chemistry* 284 (10): 6027-31. <https://doi.org/10.1074/jbc.R800009200>.
- Zhou, Shuxia, Hua Zhou, Peter J. Walian, et Bing K. Jap. 2005. « CD147 is a regulatory subunit of the  $\gamma$ -secretase complex in Alzheimer's disease amyloid  $\beta$ -peptide production ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 102 (21): 7499-7504. <https://doi.org/10.1073/pnas.0502768102>.
- Ziegler-Graham, Kathryn, Ron Brookmeyer, Elizabeth Johnson, et H. Michael Arrighi. 2008. « Worldwide Variation in the Doubling Time of Alzheimer's Disease Incidence Rates ». *Alzheimer's & Dementia* 4 (5): 316-23. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2008.05.2479>.
- Zou, Chengyu, Sophie Crux, Stephane Marinesco, Elena Montagna, Carmelo Sgobio, Yuan Shi, Song Shi, et al. 2016. « Amyloid precursor protein maintains constitutive and adaptive plasticity of dendritic spines in adult brain by regulating D-serine homeostasis ». *The EMBO Journal* 35 (20): 2213-22. <https://doi.org/10.15252/embj.201694085>.
- Zou, Kun, Jian-Sheng Gong, Katsuhiko Yanagisawa, et Makoto Michikawa. 2002. « A Novel Function of Monomeric Amyloid  $\beta$ -Protein Serving as an Antioxidant Molecule against Metal-Induced Oxidative Damage ».